

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR
PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE VON BLASENTUMOREN
MIT HÄMATOPORPHYRIN-DERIVAT (HpD)**

RALPH DIETRICH

1984

AUS DER UROLOGISCHEN KLINIK
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor : Prof. Dr. E.Schmiedt

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE
VON BLASENTUMOREN MIT HÄMATOPORPHYRIN-DERIVAT (HpD)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ralph Dietrich
aus München

München 1984

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. - Doz. Dr. D. Jocham
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Schmiedt
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	15. 5. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
2.	<u>PHOTODYNAMISCHE THERAPIE MALIGNER TUMOREN MIT HÄMATOPORPHYRIN-DERIVAT (HpD) UND LASER-LICHT</u>	5
2.1	Geschichtlicher Überblick über die Photoradio- therapie mit photosensibilisierenden Substanzen	5
2.2	Charakterisierung des HpD unter chemischen, physikalischen und pharmakologischen Gesichts- punkten	8
2.2.1	Präparation der Substanz	8
2.2.2	Molekularstruktur des HpD und Identifizierung einzelner Bestandteile	9
2.2.3	Fluoreszenz und Absorptionsverhalten des HpD und Grundlagen seiner photodynamischen Wirkung	10
2.2.4	Biochemische Substrate und zelluläre Angriffs- punkte photodynamischer Reaktionen	12
2.2.5	Dosierung und Pharmakokinetik des HpD	13
2.3	Diagnostische und therapeutische Anwendung der photodynamischen Verfahren in klinischen Studien	15

3.	<u>MATERIALIEN</u>	19
3.1	Tumormodelle	19
3.1.1	Chemisch induziertes Blasenkarzinom der Ratte	19
3.1.2	Transurethral in die Blasenwand transplantiertes "Brown-Pearce" Tumor beim Kaninchen	19
3.1.3	Chemisch induziertes Blasenkarzinom beim Hund	19
3.2	Versuchstiere	19
3.2.1	Ratten	19
3.2.2	Kaninchen	19
3.2.3	Hunde	20
3.3	Substanzen und Reagentien	20
3.3.1	Narkose bei Ratten	20
3.3.2	Narkose bei Kaninchen	20
3.3.3	Narkose bei Hunden	20
3.3.4	HpD	21
3.3.5	Tumorinduktion bei Ratten	21
3.3.6	Kultivierung der Brown-Pearce Zellen	21
3.3.7	Vitalitätstestung der Zellkulturen	21
3.3.8	Farbstofflösung für den Farbstoff-LASER	21
3.3.9	Streumedium für integrale Bestrahlung	21
3.4	Geräte und sonstige Materialien	22
3.4.1	Zellzüchtung	22
3.4.2	Endoskope und Zubehör	22
3.4.3	Fotografische Dokumentation	23
3.4.4	Messgeräte und Schreiber	23
3.4.5	LASER-Systeme und Bestrahlungszubehör	23

4.	<u>METHODIK</u>	24
4.1	Herstellung und Verabreichung von HpD	24
4.2	Tumormodell - Rattenharnblase	24
4.2.1	Chemische Induktion von Blasenkarzinomen bei Ratten mit BBN	24
4.2.2	Versuchsanordnung und Durchführung der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	27
4.2.2.1	Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	29
4.2.2.2	Zeilenförmige LASER-Bestrahlung der Rattenblasen	29
4.2.2.2.1	Versuche zur zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Rattenblase nach intraperitonealer Injektion von HpD	29
4.2.2.2.2	Versuche zur zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Rattenblase nach intravenöser Injektion von HpD	30
4.2.2.2.2.1	Vergleiche zwischen Bestrahlungsversuchen nach intraperitonealer und intravenöser Verabreichung vom HpD	30
4.2.2.2.2.2	Bestrahlungseffekte nach intravenöser Verabreichung von HpD im Hinblick auf unterschiedliche HpD-Inkubationszeiten	31
4.2.2.2.3	Kontrollversuche : zeilenförmige LASER-Bestrahlung der Rattenharnblase ohne Photosensibilisierung	32
4.2.2.2.3.1	LASER-Bestrahlung nicht mit HpD photosensibilisierter Rattenblasentumoren	32
4.2.2.2.3.2	LASER-Bestrahlung nicht photosensibilisierter tumorfreier Rattenharnblasen mit verschiedenen Bestrahlungsdosen	32
4.2.3	Versuchsanordnung und Durchführung der homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	33

4.2.3.1	Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei homogener LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	36
4.2.3.2	Übersicht über die Versuche zur homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenblasen	44
4.2.3.2.1	Homogene LASER-Bestrahlung von Rattenblasen mit nicht infiltrierend wachsenden Tumoren	44
4.2.3.2.1.1	Homogene LASER-Bestrahlung nicht infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 17 h HpD-Inkubationszeit	44
4.2.3.2.1.2	Homogene LASER-Bestrahlung nicht infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 55 h HpD-Inkubationszeit	45
4.2.3.2.2	Homogene LASER-Bestrahlung von Rattenblasen mit infiltrierend wachsenden Tumoren	45
4.2.3.2.2.1	Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 17 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm^2	45
4.2.3.2.2.2	Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 17 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm^2	46
4.2.3.2.2.3	Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 55 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm^2	46
4.2.3.2.2.4	Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 55 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm^2	46
4.2.3.2.3	Kontrollversuche zur homogenen Bestrahlung von Rattenblasen	47
4.2.3.2.3.1	Bestrahlung tumortragender Rattenblasen ohne Photosensibilisierung mit HpD, Bestrahlungsdosis 260 J/cm^2	47
4.2.3.2.3.2	Bestrahlung tumorfreier Rattenblasen, HpD-Inkubationszeiten von 30 min - 48 h	47
4.2.3.2.3.3	Bestrahlung tumorfreier Rattenblasen ohne Photosensibilisierung mit HpD, Bestrahlungsdosen ansteigend von 50 J/cm^2 - 700 J/cm^2	48

4.3.	Tumormodell - Brown-Pearce Transplantattumor der Kaninchenharnblase	48
4.3.1	Züchtung und Transplantation von Brown-Pearce Tumorzellen	48
4.3.2	Versuchsanordnung und Durchführung der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen	50
4.3.2.1	Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei zeilenförmiger LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen	52
4.3.2.2	Übersicht über die Versuche zur zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Kaninchenblasen	52
4.3.2.2.1	Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen, HpD-Inkubationszeit im Mittel 45 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 81 J/cm ²	52
4.3.2.2.2	Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen, HpD-Inkubationszeit im Mittel 68 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 56 J/cm ²	53
4.3.2.2.3	Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen nach zweimaliger Gabe von HpD, letzte HpD-Inkubationszeit im Mittel 21 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 80 J/cm ²	53
4.3.3	Versuchsanordnung und Durchführung der integralen LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen	53
4.3.3.1	Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei integraler LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen	55
4.3.3.2	Übersicht über die Versuche zur integralen LASER-Bestrahlung der Kaninchenblasen	56
4.3.4	Kontrollversuche zur LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen	57
4.4	Tumormodell - chemisch induzierter Tumor der Hundeharnblase	57
4.4.1	Integrale LASER-Bestrahlung der Hundeharnblase	58
4.4.1.1	Integrale LASER-Bestrahlung des chemisch induzierten Blasenkarzinoms beim Hund	58
4.4.1.2	Integrale LASER-Bestrahlung tumorfreier Harnblasen beim Hund	61

4.5	Versuche zur Bestimmung der Oberflächentemperatur und zur Beobachtung von Schleimhautveränderungen unmittelbar nach LASER-Bestrahlung bei der Photoradiotherapie	61
4.5.1.	Schleimhautveränderungen unmittelbar nach LASER-Bestrahlung HpD photosensibilisierter Rattenblasentumoren	61
4.5.2	Temperaturkontrolle mit einer AGA-Thermokamera während der LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	62

5.	<u>ERGEBNISSE</u>	66
5.1	Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Rattenharnblasen	66
5.1.1	Effekte der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	66
5.1.1.1	Bestrahlungseffekte nach intraperitonealer Verabreichung von HpD	66
5.1.1.2	Bestrahlungseffekte nach intravenöser Verabreichung von HpD	67
5.1.1.2.1	Unterschiede der Bestrahlungseffekte nach intravenöser und intraperitonealer Verabreichung von HpD und niedriger Bestrahlungsdosis	68
5.1.1.2.2	Bestrahlungseffekte nach intravenöser Verabreichung von HpD im Hinblick auf unterschiedliche HpD Inkubationszeiten	70
5.1.1.3	Kontrollversuche : zeilenförmige LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen ohne Photosensibilisierung	72
5.1.1.3.1	Effekte nach LASER-Bestrahlung nicht mit HpD photosensibilisierter Rattenblasentumoren	72
5.1.1.3.2	Effekte einer LASER-Bestrahlung nicht photosensibilisierter tumorfreier Rattenharnblasen mit verschiedenen Bestrahlungsdosen	73
5.1.2	Effekte der homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	75
5.1.2.1	Homogene LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen mit nicht infiltrierend wachsenden Tumoren	75
5.1.2.1.1	Behandlung nach 17 h HpD Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis im Mittel 139 J/cm^2	75
5.1.2.1.1.1	Vergleich der Therapieeffekte nach 120 J/cm^2 und 150 J/cm^2 , HpD Inkubationszeit 17 h	77
5.1.2.1.2	Behandlung nach 55 h HpD Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm^2	79

5.1.2.2	Effekte einer homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen mit infiltrativem Tumorwachstum	80
5.1.2.2.1	Behandlung nach 17 h HpD Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm ²	80
5.1.2.2.2	Behandlung nach 17 h HpD Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm ²	82
5.1.2.2.3	Behandlung nach 55 h HpD Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm ²	83
5.1.2.2.4	Behandlung nach 55 h HpD Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm ²	84
5.1.2.3	Kontrollversuche zur homogenen Bestrahlung von Rattenharnblasen	85
5.1.2.3.1	Bestrahlung tumortragender Rattenharnblasen ohne Photosensibilisierung mit HpD, Bestrahlungsdosis 260 J/cm ²	85
5.1.2.3.2	Bestrahlung tumorfreier Rattenharnblasen, HpD-Inkubationszeiten von 30 min - 48 h, Bestrahlungsdosis 120 J/cm ²	86
5.1.2.3.3	Bestrahlung tumorfreier, nicht photosensibilisierter Rattenharnblasen, Bestrahlungsdosen von 50 J/cm ² - 700 J/cm ²	89
5.2	Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Kaninchenharnblasen	91
5.2.1	Effekte zeilenförmiger LASER-Bestrahlung transplantierter Brown - Pearce Tumoren der Kaninchenharnblase	91
5.2.1.1	Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen HpD Inkubationszeit im Mittel 45 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 81 J/cm ²	91
5.2.1.2	Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen, HpD Inkubationszeit im Mittel 68 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 56 J/cm ²	93
5.2.1.3	Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen nach zweimaliger Gabe von HpD, letzte HpD Inkubationszeit im Mittel 21 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 80 J/cm ²	94

5.2.2	Effekte integraler Bestrahlung transplan- tierter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenharnblase	95
5.2.3	Kontrollversuche zur LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen	96
5.3	Integrale LASER-Bestrahlung der Hundeharnblase	97
5.3.1	Integrale Bestrahlung des chemisch induzierten Blasenkarzinoms beim Hund	97
5.3.2	Integrale LASER-Bestrahlung tumorfreier Harn- blasen beim Hund	102
5.3.2.1	Integrale LASER-Bestrahlung einer tumorfreien Harnblase beim Hund. HpD Inkubationszeit 90 h,	102
5.3.2.2	Integrale LASER-Bestrahlung einer tumorfreien Harnblase beim Hund, HpD Inkubationszeit 60 h,	103
5.4.	Ergebnisse der Untersuchungen zu Veränderungen der Schleimhaut und der Oberflächentemperatur bei der Photoradiotherapie	104
5.4.1	Schleimhautveränderungen unmittelbar nach LASER-Bestrahlung HpD photosensibilisierter Rattenblasentumoren	104
5.4.2	Ergebnisse der Temperaturkontrolle mit einer AGA- Thermokamera während der LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen	105

6.	<u>DISKUSSION</u>	107
6.1	Besprechung der Methodik	107
6.1.1	HpD	107
6.1.2	LASER-Systeme und Bestrahlungsmethoden	107
6.1.3	Chemisch induzierte Blasenkarzinome der Ratte	109
6.1.4	Transplantation und Wachstum von Brown-Pearce Tumoren	110
6.1.5.	Chemisch induziertes Blasenkarzinom beim Hund	112
6.2	Besprechung der Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Rattenblasen	112
6.2.1	Zeilenförmige Bestrahlung von Rattenblasen	112
6.2.1.1	Einfluß verschiedener HpD-Applikationsformen	112
6.2.1.2	Auswirkungen der ungleichmäßigen LASER-Lichtverteilung bei zeilenförmiger Bestrahlung	113
6.2.2	Homogene LASER-Bestrahlung nicht infiltrierend wachsender Blasentumoren der Ratte	114
6.2.3	Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren der Ratte	116
6.2.4	Kontrollversuche zur Photoradiotherapie tumortragender Rattenblasen	117
6.3	Besprechung der Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Kaninchenblasen	121
6.3.1	Zeilenförmige LASER-Bestrahlung tumortragender photosensibilisierter Kaninchenblasen	121
6.3.2	Integrale LASER-Bestrahlung tumortragender photosensibilisierter Kaninchenblasen	123
6.4	Besprechung der Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Hunde-Harnblasen	125
6.4.1	Integrale LASER-Bestrahlung chemisch induzierter Blasentumoren des Hundes	125
6.4.2	Integrale LASER -Bestrahlung tumorfreier Hundeharnblasen	126

7.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	127
----	------------------------	-----

8.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	129
----	-----------------------------	-----

1.

EINLEITUNG

Als zweithäufigster maligner Tumor des Urogenitaltraktes und häufigste maligne Neubildung in den Harnwegen ist das Blasenkarzinom heute etwa für 3,5 % aller Krebstodesfälle verantwortlich (44).

Auslösende Noxen sind exogene und endogene Kanzerogene wie z.B. aromatische Amine, Nitrosamine und Intermediärprodukte des Tryptophanstoffwechsels. Aber auch chronische Entzündungen der Blase begünstigen die Entstehung von Tumoren (52).

Blasentumoren können solitär oder multipel auftreten. So findet man auch endoskopisch bei solitär erscheinenden Primärtumoren in 25 % Atypien und Carcinomata in situ in makroskopisch unauffälliger Schleimhaut(52). Die Rezidivquote nach Entfernung eines nicht infiltrierenden Primärtumors beträgt 50 - 70 %. Die ersten Rezidive weisen in 10 - 20 % ein höheres Infiltrationsstadium und in 20 % einen zunehmend ungünstigeren Differenzierungsgrad auf (43). Ein zweites Rezidiv tritt dann bereits in 84 % der Fälle auf.

Multiple Tumoren der Blase oder exophytische Tumoren mit zusätzlichen und multilokulären Carcinomata in situ weisen also durch die Zunahme der Rezidivquote und eine Erhöhung des ungünstigeren Differenzierungsgrades eine schlechte Prognose auf. Diese Tumoren können kurativ bislang erfahrungsgemäß nur durch die totale Zystektomie behandelt werden (52).

Dieser Eingriff vermindert selbst bei erfolgreicher Entfernung des Tumors durch die radikale Zystektomie erheblich die Lebensqualität des Patienten. Hierzu kommt das hohe Operationsrisiko einer supravessikalen Harnableitung. Bei einem Durchschnittsalter der Er-

kranken von 66 - 70 Jahren beträgt die Letalität z.B. bei der supravescikalen Harnableitung in Form eines Colon-Conduits 10 - 13 % (52). Bei der supravescikalen Harnableitung in Form eines Ileum-Conduits sind andererseits in 10 % gehäufte Steinbildung und in 10 - 20 % pyelonephritische Veränderungen die unter Umständen schicksalbestimmenden Folgeerscheinungen der künstlichen Harnableitung (52).

Gut differenzierte, nicht infiltrierende, primäre und solitäre Blasen Tumoren können durch transurethrale Elektroresektion ausreichend behandelt und kontrolliert werden (43). Für eine Vielzahl von Fällen - insbesondere bei Vorliegen der oben beschriebenen Indikationen zur radikalen Zystektomie - bedarf es jedoch angesichts der den Kranken erheblich belastenden Behandlungsstrategien weiterer Verbesserungen der diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen.

Fortschritte in der Behandlung des Blasenkarzinoms und eine Erleichterung der Leiden vieler Patienten stellt ihrem Konzept nach die Photoradiotherapie, abgekürzt PRT, in Aussicht.

Bei der Potoradiotherapie wird Tumorgewebe, das mit einem Photosensibilisator selektiv lichtempfindlich gemacht wurde, durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlängen photodynamisch zerstört.

Als Photosensibilatoren finden überwiegend bestimmte Farbstoffe Verwendung. Zwei grundlegende Eigenschaften dieser Farbstoffe macht man sich hierbei zunutze :

1. die Vermittlung einer lichtinduzierten, photochemischen, nicht thermischen Zytotoxizität (Photosensibilisierung), (12,14,15,16,51).

2. die selektive Einlagerung oder Speicherung solcher Substanzen in Tumorgeweben. Es ist noch nicht geklärt, ob es sich tatsächlich um einen Anreicherungsmechanismus oder um eine verzögerte Ausscheidung der Substanzen aus Tumoren handelt (18, 38).

Als Farbstoffe bzw. Medikamente mit photosensibilisierenden Eigenschaften sind z.B. Fluoreszin, Acridin Orange, Tetracycline und Hämatoporphyrinderivat (HpD) bekannt.

Mit der PRT stehen neue Therapieansätze zur Verfügung, die folgende Vorteile bei der Therapie maligner Tumoren gegenüber konventionellen Behandlungsmethoden denkbar erscheinen lassen:

1. die Möglichkeit, durch kontaktfreie Bestrahlung Tumoren wenig invasiv an der Körperoberfläche und in Hohlorganen zu behandeln.

2. die geringere Belastung der Kranken durch die schonendere Behandlungsform.

3. die Möglichkeit, mit einer ungezielten flächenhaften Bestrahlung auch ohne Kenntnis der genauen Lokalisation eines Tumors eine Behandlung von Tumorstadien durchzuführen, bei denen makroskopisch noch kein Tumor erkennbar ist.

4. diese Erfassung von Tumorfrühstadien eröffnet die Aussicht auf eine erhöhte Heilungsrate.

5. die Verringerung der Rezidivquote des Blasenkarzinoms bei multilokulärem Tumorwachstum durch eine sogenannte integrale Behandlung aller Tumoranteile, d.h. unter Miterfassung des prognostisch besonders ungüns-

tigen, therapeutisch bislang schlecht beeinflussbaren Carcinoma in situ der Blase.

6. die selektive Behandlung und Zerstörung von Tumoren ohne Schädigung gesunden Gewebes.

7. die Nutzung der zusätzlich vorhandenen Fluoreszenzeigenschaften dieser photosensibilisierenden Substanzen könnte gegebenenfalls die Frühdiagnose und Lokalisation makroskopisch noch nicht sichtbarer Tumoren ermöglichen.

Im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojekts (Leitung Dr. D. Jocham) der Urologischen Klinik der Universität München (Direktor Prof. Dr. E. Schmiedt), des Instituts für angewandte Optik der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (Leiter Prof. Dr. W. Waidelich) und des Instituts für chirurgische Forschung der Universität München (Vorstand Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel) sollte die vorliegende Arbeit anhand von tierexperimentellen Untersuchungen Erfahrungen und Daten für eine Anwendung der Photoradiotherapie mit dem Photosensibilisator Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) und LASER-Licht bei der Therapie von Blasentumoren erarbeiten. Im einzelnen sollten Aufschlüsse über Dosierung und Inkubationszeiten von HpD, Bestrahlungstechniken sowie die Intensität und Dauer der Bestrahlung gewonnen werden. Die Wirksamkeit der Therapie sollte in Abhängigkeit vom Tumortyp und Tumorstadium untersucht werden. Hierbei wurde auf die in anderem Zusammenhang ermittelten Ergebnisse von in vitro Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe aufgebaut. Diese bisherigen Ergebnisse sollten durch die Erstellung eines standardisierbaren Tumor-Therapie-Modells ergänzt und auch erweitert werden.

Die eigenen Untersuchungen waren dabei in das Gesamtkonzept der Arbeitsgruppe integriert, dessen Ziel die Entwicklung eines völlig neuartigen Therapieverfahrens des multifokalen Blasenkarzinoms mit Erfassung auch des endoskopisch meist nicht erkennbaren Carcinoma in situ ist.

2. PHOTODYNAMISCHE THERAPIE MALIGNER TUMOREN MIT HÄMATOPORPHYRIN-DERIVAT (HpD) UND LASER- LICHT

2.1 Geschichtlicher Überblick über die Photoradiotherapie mit photosensibilisierenden Substanzen

Erstmals wurde die toxische Wirkung einiger fluoreszierender Stoffe unter Lichteinwirkung um die Jahrhundertwende von RAAB und v.TAPPEINER erkannt: 1900 beschrieben sie den schädigenden Einfluß von Acridin, Phenylacridin, Eosin und Chinin auf Paramaecien (Protozoen) in Verbindung mit Lichtbestrahlung. Weder die Substanzen für sich, noch die alleinige Lichtbestrahlung, noch das während der Bestrahlung erzeugte Fluoreszenzlicht vermochten die Paramaecien zu schädigen. Nur die Kombination von photosensibilisierender Substanz und Lichtbestrahlung erwies sich in diesen Versuchen als phototoxisch und führte zur Abtötung der Einzeller (42,48,49).

1903 untersuchte v.TAPPEINER das Verhalten von Enzymen und Toxinen unter der Einwirkung von fluoreszierenden Stoffen und Lichtbestrahlung. Er berichtete über einen vollständigen therapiebedingten Wirkungsverlust der Enzyme und Toxine. Im gleichen Jahr begann er Thera-

pieversuche mit fluoreszierenden Substanzen. Hierbei bestrich er verschiedene Hautläsionen mit Eosin und bestrahlte diese mit einer Bogenlampe. Er beschrieb insgesamt 9 Fälle: ein Ulcus rodens (Basaliom), 2 nicht näher beschriebene Fälle von Hautkrebs und 6 ulcerös-tuberkulöse Erkrankungsherde, welche er auf diese Weise vollständig zur Abheilung bringen konnte (50).

1913 berichtete MEYER-BETZ ausführlich über die im Selbstversuch beobachtete photosensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins, eines aus Rinderblut gewonnenen metallfreien Hämoglobinabkömmlings.

Bereits wenige Stunden nach der intravenösen Injektion von 0,2 g Hämatoporphyrin konnte die photosensibilisierende Wirkung nach Bestrahlung eines Hautareals mit einer Finsenlampe (Kohlenbogenlampe) beobachtet werden. Die photosensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins hielt etwa 2 Monate an. Sie äußerte sich durch starkes Brennen, eine Rötung und Bläschenbildung in den dem Sonnenlicht z.T. nur kurzzeitig ausgesetzten Hautpartien. In der weiteren Folge schälten sich die bestrahlten Hautpartien. Letzlich heilten die Krankheiterscheinungen unter starker Pigmentierung narbig ab (39).

Erste Beobachtungen über eine selektive Speicherung des Hämatoporphyrins im Tumorgewebe berichteten POLICARD 1924 und KÖRBLER 1932. In ihren Arbeiten beschrieben sie die rote Fluoreszenz einiger Tumoren in Verbindung mit einer Hämatoporphyrinurie (31, 41).

1942 untersuchten AULER und BANZER Fluoreszenzerscheinungen von Tumoren bei Menschen und Ratten. Sie konnten nach Injektion von Hämatoporphyrin im Tumorge-

webe, nicht jedoch in normalem Gewebe eine für Hämatorporphyrin charakteristische Fluoreszenz nachweisen (11). 1948 ergaben die Studien von FIGGE, daß alle von ihm verwendeten Porphyrine, d.h. Hämatorporphyrin sowie markierte und nichtmarkierte Metalloporphyrine eine verstärkte Affinität zu experimentellen Tumoren bei Mäusen aufwiesen. Ebenso konnte er in Lymphknoten, im verletzten, sich regenerierenden und im embryonalen Gewebe einen erhöhten Gehalt dieser Porphyrine nachweisen (18).

1955 entdeckte SCHWARZ, daß es sich beim Hämatorporphyrin nicht um eine Reinsubstanz, sondern um ein Gemisch verschiedenster Porphyrine mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften handelt (45).

Auf Grund dieser Arbeit versuchten LIPSON und Mitarbeiter, durch Reaktion des Hämatorporphyrins mit einem Essigsäure-Schwefelsäure-Gemisch ein Derivat des Hämatorporphyrins herzustellen. In ihren Untersuchungen verglichen sie die Eigenschaften des unbehandelten Hämatorporphyrins (Hp) mit dem von ihnen synthetisierten Hämatorporphyrinderivat (HpD). Es zeigte sich, daß das HpD eine stärkere photodynamische Wirkung und eine kleinere letale Wirkungs-dosis (LD 100 HpD kleiner LD 100 Hp) gegenüber dem unbehandelten Hämatorporphyrin besitzt. HpD erwies sich somit einerseits als der wirksamere Photosensibilisator, andererseits aber auch als die toxischere Substanz (38). Desweiteren bewiesen LIPSON und Mitarbeiter 1961 in einer Arbeit über die Verwendungsmöglichkeiten von HpD bei der Entdeckung von Tumoren (35), daß das von ihnen verwendete HpD auch eine größere Affinität gegenüber Tumorgewebe besaß und sich in einer größeren Zahl unterschiedlicher Tumoren nachweisen ließ (der Nachweis erfolgte anhand der typischen HpD-Fluoreszenz).

HAEMATOPORPHYRIN



Mol. Gew. 598,6

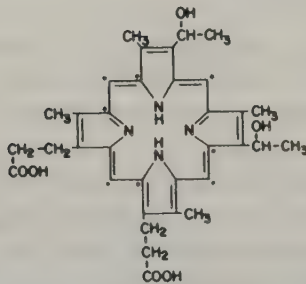


Abb.1:

Summenformel, Molekulargewicht und Strukturformel des Hämatoporphyrins

2.2 Charakterisierung des HpD unter chemischen, physikalischen und pharmakologischen Gesichtspunkten

2.2.1 Präparation der Substanz

1975 trennten DOUGHERTY und Mitarbeiter die nach LIPSON (38, 35) und GREGORIE (21) bereitete HpD-Lösung mittels Dünnschichtchromatographie in weitere Bestandteile auf. Mindestens 4 Komponenten waren anhand dieser Methode nachzuweisen, wobei DOUGHERTY keine näheren Angaben über die chemische Struktur der Be-

standteile des HpD machte (16). In den Jahren 1981 und 1982 wurden dann von mehreren Forschergruppen umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um die Struktur und Eigenschaften der Bestandteile des HpD aufzuklären. Alle Autoren verwendeten HpD, welches nach der Vorschrift von LIPSON (38, 35) hergestellt worden war: bei mehreren Firmen erhältliches, rekristallisiertes Hämatorporphyrin-Hydrochlorid wurde in einer Lösung, bestehend aus 19 Volumenteilen Eisessig und einem Volumenteil konzentrierter Schwefelsäure gelöst und für 15 Minuten stehengelassen. Die Lösung wurde filtriert und der abgefilterte ungelöste Niederschlag verworfen. Die Lösung wurde nun mit einer etwa 3 %igen Natriumacetatlösung auf pH 7 eingestellt. Als Indikator wurde Kongorotpapier verwendet. Während des Vorgangs der Neutralisation fiel HpD aus. Der Niederschlag wurde abfiltriert, einige Male mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

Die getrocknete Substanz wurde in einer Kochsalzlösung gelöst und der pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxyd in den alkalischen Bereich verschoben. Durch Salzsäure wurde der pH-Wert abschließend auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung, die HpD in einer Konzentration von 5 mg/ml enthielt, wurde mittels eines 10 µ Millipore-Filters sterilfiltriert, in Lichtschutzflaschen abgefüllt und bis zur Verwendung tiefgefroren.

2.2.2 Molekularstruktur des HpD und Identifizierung einzelner Bestandteile

1981 gelang es BONNET durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie 9 Bestandteile des HpD zu isolieren und

durch chromatographischen und spektroskopischen Vergleich mit Porphyrinen bekannter Struktur zu identifizieren (4). An einem Testmodell zur Photoradiotherapie stellte BERENBAUM 1982 Vergleiche bezüglich der photodynamischen Aktivität dieser Komponenten des HpD an. Alle Bestandteile der polaren Fraktion, Hämatoporphyrin, Hydroxyäthylvinyldeuteroporphyrin mit seinen Isomeren und Protoporphyrin erwiesen sich als photodynamisch inaktiv, während Hämatoporphyrinmonoacetat und seinen Isomeres, Hämatoporphyrindiacetat und Acetoxyvinyldeuteroporphyrin und sein Isomeres sich als photodynamisch aktiv zeigten. Angesichts der Tatsache, daß die Photoaktivität der Bestandteile des HpD erst nach Alkalisierung der Substanzen auftrat und die Porphyrinmoleküle im alkalischen Milieu zur Bildung von Dimeren neigten, vermuteten BERENBAUM und Mitarbeiter als die eigentlich wirksamen Substanzen Dimere der aktiven Hämatoporphyrinderivate (3).

2.2.3 Fluoreszenz und Absorptionsverhalten des HpD und Grundlagen seiner photodynamischen Wirkung

Eine wesentliche Eigenschaft des HpD, welche zur Entdeckung der tumorselektiven Anreicherung des HpD führte, ist die Fluoreszenz (1).

Die Anregung mit violettem Licht erzeugt eine deutliche Rotfluoreszenz. Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei 402 nm bei einem molaren Extinktionskoeffizienten von $7,4 (\pm 0,5) 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Die Fluoreszenzausbeute beträgt $0,024 \pm 0,005$ Photonen des roten Bereichs pro absorbiertem violettem Photon.

Die Emission erstreckt sich über einen Bereich von 600-700 nm (11).

Das Absorptionsspektrum des HpD weist 5 Maxima auf: bei 402 nm, 540 nm, 573 nm, 597 nm, 630 nm, welche der Amplitude nach vom blauen zum roten Bereich hin abnehmen.

Das für die Durchführung der PRT günstigste therapeutisch nutzbare relative Maximum liegt für HpD bei 630 nm.

Bei 630 nm ist im Vergleich zu den anderen HpD-Anregungsmaxima die Transmission des Lichts im Gewebe am größten und die Absorption am kleinsten. Hierdurch ist auch eine mögliche thermische Schädigung des Gewebes durch das therapeutisch eingesetzte Licht am geringsten (30, 40).

Für das Ausmaß der photodynamischen Aktivierung des HpD sind zwei Größen von Bedeutung: zum einen die Wellenlänge des eingestrahnten bzw. absorbierten Lichts und zum anderen die Bestrahlungsdosis (Joule/cm^2) (30). In Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Dosis des Aktivierungslichtes wurden bisher zwei die phototoxische Reaktion des HpD hervorrufende Reaktionsmechanismen identifiziert: zum einen die Bildung von Hydroxylradikalen und zum anderen die Entstehung von Sauerstoffsingulets.

Beide Reaktionsmechanismen wurden anhand von Schlüsselreaktionen erkannt, für deren Ablauf Hydroxylradikale oder Sauerstoffsingulets benötigt werden. Als Nachweisreaktion für die Entstehung von Hydroxylradikalen beschrieb HARIHARAN die intrazelluläre Bildung von Thyminglykol. Hierbei handelt es sich um eine chemische Substanz, welche typischerweise unter der Einwirkung von HpD und Licht als Folge einer Hydroxylradikalwirkung aus Thymin entsteht. Thyminglykol konnte bei anderen Reaktionen, bei welchen ausschließlich Sauerstoffsingulets produziert wurden, nicht nachgewiesen werden. Es entstand auch kein Thyminglykol, wenn die Hydroxylradikale durch Dimethylsulfoxyd abgefangen wurden (22). Nach ähnlichen Prinzipien, jedoch

schon einige Jahre früher, identifizierte WEISHAUPT Singulett-sauerstoff als ein Agens, welches ebenfalls für die phototoxische Wirkung des HpD unter Lichteinwirkung verantwortlich ist. Die photodynamische Inaktivierung konnte vollständig durch 1-3-Diphenylisobenzofuran aufgehoben werden, während das hieraus durch Reaktion mit Sauerstoffsingulett entstehende Reaktionsprodukt o-Dibenzoylbenzen quantitativ nachgewiesen werden konnte (51).

Als dritter Reaktionsmechanismus wird außerdem in letzter Zeit die Entstehung von Hyperoxid (O_2^-) diskutiert. In einem Reaktionsgemisch aus DMPO (5-5-Dimethylpyrrolin-1-oxid) und Hämatorporphyrin lassen sich durch Zugabe von Hyperoxiddismutase die für Hyperoxid typischen Signale der Elektronenspinresonanz unterdrücken. Ob Hyperoxid als kurzlebiges, direkt schädigendes Agens vorliegt oder über die Bildung von Hydroxylradikalen indirekt mit Gewebe reagiert, ist zur Zeit noch nicht geklärt (6).

2.2.4

Biochemische Substrate und zelluläre Angriffspunkte photodynamischer Reaktionen

Die durch die photooxidative Wirkung des HpD und anderer photosensibilisierender Porphyrine angegriffenen biochemischen Strukturen sind derzeit nur teilweise bekannt. Ebenso sind sicher noch nicht alle zellulären Substrate photodynamischer Reaktionen gefunden. Nach derzeitiger Kenntnis sind folgende Verbindungen Ziel photooxidativer Angriffe:

a) ungesättigte Fettsäuren und Steroide, die zu Hydroperoxiden oxidiert werden.

b) Proteine, welche durch den Angriff an funktionellen Gruppen einzelner Aminosäuren ihre Konfiguration, ihre mechanischen Eigenschaften und ihr antigenes Verhalten ändern oder ihre hormonelle und enzymatische Aktivität verlieren.

c) Nukleinsäuren, bei welchen sich durch Angriff am Guanin Einzel- und Doppelstrangbrüche ergeben.

d) NADH, NADPH und Hyaluronsäure, die einer Oxidation unterliegen.

Außerdem werden Schäden auf zellulärer Ebene an Membranstrukturen, verschiedenen Organellen und an Chromosomen beobachtet (46, 47).

2.2.5

Dosierung und Pharmakokinetik des HpD

Um photodynamisch wirksame HpD-Konzentrationen in Tumorgewebe zu erreichen, wird HpD je nach Spezies in verschiedenen Dosierungen verabreicht:

- bei Mäusen und Ratten 2,5 - 10 mg/kg KG
- bei Katzen, Hunden und Kaninchen 5 mg/kg KG
- beim Menschen 2 - 5 mg/kg KG

Diese Dosisangaben stellen Erfahrungswerte dar, durch welche bei ausreichenden Lichtschutzmaßnahmen keine allgemeintoxischen Nebenwirkungen hervorgerufen werden (14, 15, 26, 33).

Vergleichsweise beträgt die letale Dosis LD 50 für Mäuse 150 mg/kg KG, so daß eine ausreichende therapeutische Breite vorzuliegen scheint (38). Die mit den oben genannten HpD-Dosierungen erreichbaren Tumorkonzentrationen und Normalgewebespiegel bewegen sich in

Bereichen von 2 - 30 $\mu\text{g/g}$ Gewebe. Die maximalen Gewebekonzentrationen werden im Normalgewebe zwischen 4 h und 24 h nach Injektion, im Tumorgewebe erst zwischen 24 h und 48 h nach Injektion erreicht, zu Zeiten also, zu denen die HpD-Konzentrationen im Normalgewebe bereits wieder abgesunken sind. Tumorgewebekonzentrationen liegen 48 h nach HpD-Verabreichung zwar unter den Konzentrationen von Leber, Milz und Niere, jedoch über den Gewebespiegeln von Lunge, Haut und Muskulatur (19).

Eine selektive Speicherung des HpD im Blasen-tumorgewebe wurde qualitativ schon 1976 anhand von Fluoreszenzuntersuchungen von KELLY und Mitarbeitern bewiesen (29). BENSON und Mitarbeiter bestätigten diese selektive Anreicherung 1982 auch für das menschliche Carcinoma in situ der Harnblase (2). Quantitative Untersuchungen bezüglich der HpD-Konzentrationen in experimentellen Blasen-tumoren wurden von der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten in Tumorgewebe deutlich höhere HpD-Spiegel als in der gesunden Blasenschleimhaut. Die HpD-Konzentrationen sanken im gesunden Gewebe nach 24 h - 48 h, während ein vergleichbarer Abfall der HpD-Konzentration im Tumorgewebe erst nach 48 h - 72 h gemessen wurde (53, 27).

Eine besonders hohe HpD-Gewebekonzentration scheint sich durch intravenöse Verabreichung von HpD erreichen zu lassen. Gegenüber der intraperitonealen Verabreichung, wie sie von vielen Autoren praktiziert wird, beschrieben z.B. CARPENTER und Mitarbeiter eine intensivere Fluoreszenz nach i.v. Injektion von HpD (7).

2.3

Diagnostische und therapeutische Anwendungen der
photodynamischen Verfahren in klinischen Studien

In einer Vielzahl von Studien wurde untersucht, inwieweit sich die Fluoreszenz des HpD nach einer Anreicherung von HpD in Tumoren zur klinischen Diagnose maligner Veränderungen verwenden lässt. Zur Klärung dieser Frage boten sich besonders Gewebe an, die einer äußerlichen oder endoskopischen Beobachtung zugänglich sind. Die Fluoreszenz wurde entweder direkt beobachtet oder mit Hilfe von Bildverstärkersystemen nachgewiesen. Zum Teil konnte die Fluoreszenz auch fotografisch dokumentiert werden. Das fluoreszierende Gewebe wurde biopsiert und histologisch untersucht. Eine Übereinstimmung zwischen der Gewebefluoreszenz und dem histologisch gesicherten Tumor wurde in bis zu 80 % der Gewebeproben gefunden.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die an verschiedenen humanen Geweben mit HpD Fluoreszenz durchgeführte Tumordiagnostik.

Tab.1 Übersicht über die HpD-Fluoreszenzdiagnostik
von Tumoren in humanen Geweben

Ösophagus, Bronchialsystem	Lipson	1961	(36)
Cervix, Vagina, Mamma, Perito- neum, Rektum, Tonsillen, Gland.			
Parotis	Lipson	1961	(37)
Cervix	Gray	1967	(20)
Haut, Pharynx, Larynx, Cervix, Ösophagus, Bronchialsystem, Penis, Vulva, Urethra, Lymphknoten	Gregorie	1968	(21)
Larynx, Pharynx, Mund, Trachea	Leonard	1971	(34)
Harnblase	Kelly	1976	(29)
Bronchialsystem	Cortese	1979	(8)
Ösophagus, Bronchialsystem	Doiron	1979	(11)
Harnblase	Benson	1982	(2)

Als besonders bemerkenswert erwies es sich in diesen Studien, daß nicht nur makroskopisch erkennbare Tumoren, sondern auch das Carcinoma in situ mit Hilfe der Fluoreszenz entdeckt wurden. Diese mikroskopisch kleinen Tumoren fluoreszierten zum Teil deutlicher als großvolumige Tumoren (30).

Falsch positive bzw. negative Ergebnisse waren darauf zurückzuführen, daß einzelne fluoreszierende Tumorbezirke schwer zu biopsieren waren. Teilweise konnte jedoch auch kein Tumormaterial gewonnen werden. In anderen Fällen waren die Tumorbezirke von Blut überlagert und somit die Beobachtung der Fluoreszenz erschwert.

Die Therapie wurde entsprechend den Absorptionsmaxima für HpD und den günstigsten Transmissionsverhältnissen für Gewebe (30,40) mit Wellenlängen zwischen 600 und 700 nm durchgeführt. Leistungsstarke Lichtquellen wie Xenon-Bogenlampen mit geeigneten Filtern und bestimmte Farbstoff-LASER-Systeme ermöglichten eine wirksame Bestrahlung der Tumoren mit Licht der gewünschten Wellenlängen. Über Quarzfaserlichtleiter von weniger als 1 mm Durchmesser konnten endoskopisch auch Tumoren in Hohlorganen, z.B. im Bronchialsystem, bestrahlt werden. Tumoren an der Körperoberfläche wurden entweder direkt oder durch Einstechen des Lichtleiters in das Tumorgewebe bestrahlt.

Die meisten Patienten, die der Photoradiotherapie unterzogen wurden, hatten inoperable Tumoren bzw. ausge dehnte oder multiple Rezidive. In anderen Fällen wurden Patienten behandelt, bei denen konventionelle Therapiemethoden keinen Erfolg gebracht hatten. Die mit LASER-Licht bestrahlten Tumoren wurden unabhängig von ihrer Struktur und histologischen Beschaffenheit durch Behandlung mit HpD und LASER-Licht oft vollständig, in wenigen Fällen zumindest teilweise zerstört. Nur einige wenige Tumoren sprachen auf die Behandlung überhaupt nicht an.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die wesentlichsten der mit PRT behandelten menschlichen Tumoren.

Tab.2 Geschichtlicher Überblick der mit PRT behandelten
humanen Tumoren

Basaliom, Malignes Melanom, Mykosis Fungoides, Platten- epithelkarzinom der Haut, Chondrosarkom, Kolonkazinom, Prostatakarzinom, Korpus-Uteri- karzinom, Mammakarzinom, Angiosarkom,	Dougherty 1978 (12)
Mammakarzinom (Rezidive)	Dougherty 1979 (14)
Maligne Hirntumoren	Laws 1981 (33)
Kaposi's Sarkom, Malignes Melanom, Metastasen des Mamma- karzinoms	Dougherty 1981 (13)
Bronchialkarzinom	Cortese 1982 (9)
Bronchialkarzinom	Hayata 1982 (25)
Rezidive beim Mammakarzinom, Metastasen und Rezidive plattenepithelialer Tumoren des Ohrs, der Nase und des Halses	Dahlmann 1983 (10)

3 MATERIALIEN

3.1 Tumormodelle

Drei Tumormodelle wurden für die therapeutischen Experimente verwendet:

- 3.1.1 -chemisch induziertes Blasenkarzinom der Ratte
- 3.1.2 -transurethral in die Blasenwand transplanterter "Brown-Pearce" Tumor beim Kaninchen
- 3.1.3 -chemisch induziertes Blasenkarzinom beim Hund

3.2 Versuchstiere

3.2.1 -Ratten:

- a) Long-Evans Ratten beiderlei Geschlechts, Inzuchtstamm der Versuchstierhaltung des Instituts für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität-München.
- b) Männliche Wistar Ratten, Inzuchtstamm der Versuchstierhaltung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung m.b.H München Neuherberg.

Alle Ratten wiesen ein Durchschnittsgewicht von 250 g auf.

3.2.2 -Kaninchen:

- a) Gelbsilber-Kaninchen männlichen Geschlechts mit einem Durchschnittsgewicht von 3 kg, Eigenzucht der Fa. Riedl, Feldmoching bei München.
- b) Chinchilla-Kaninchen der Versuchstierhaltung der Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung m.b.H. München Neuherberg.

3.2.3 -Hunde:

- a) Eine Beagle-Hündin der Versuchstierzucht Prof. Strasser, Fa. Hoechst, Frankfurt/M mit einem Gewicht von ca 16 kg, welche uns freundlicherweise nach bereites erfolgter Tumorinduktion von Prof. Harzmann (Urologische Klinik der Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde.
- b) Zwei weibliche Beagle-Hunde der Versuchstierhaltung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung m b H München Neuherberg.

3.3 Substanzen und Reagentien

3.3.1 -Narkose bei Ratten:

Aether zur Narkose, Hoechst AG, Frankfurt/M;
Diaethylaether, Fa. Bender und Hobein München;
Chloralhydrat 3,6 %, Apotheke des Klinikums
Großhadern München; Ketavet^R (100 mg/ml)
Parke Davis München;

3.3.2 -Narkose bei Kaninchen:

Ketanest^R (50 mg/ml), Parke Davis München;
Ketavet^R (100 mg/ml), Parke Davis München;
Rompun^R 2 %, Bayer Leverkusen

3.3.3 -Narkose bei Hunden:

Nembutal^R (60 mg/ml), Abbot SA. Belgien;

- 3.3.4 -HpD:
 Hämatoporphyrinhydrochlorid, Fa. Hoechst-
 Roussel Corporation; Hämatoporphyrinderivat
 5mg/ml, Oncology Research and Investigation
 Inc., Cheektowaga N.Y.;
- 3.3.5 -Tumorinduktion bei Ratten:
 BBN (N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)-Nitrosamin,
 hergestellt in Forschungslaboratorien der
 Zweigniederlassung der Fa. Hoechst, Japan;
- 3.3.6 -Kultivierung der Brown-Pearce Zellen
 (Stammzellen der Fa.Hoechst, Frankfurt/M):
 Hank'sche Lösung, Apotheke des Klinikums Groß-
 hadern, München; Medium RPMI 1640 074-1800,
 Gibco Europa; foetales Kälberserum (FCS) 629 HIM,
 Gibco Europa; Antibiotikum Penicillin,
 Streptomycin 10000 IE in einer Konzentration
 von 10 ml/l Serum; Natrium Bicarbonat 7,5 %;
- 3.3.7 -Vitalitätstestung der Zellkulturen:
 Kochsalz 1,8 %
 Trypanblau, Fa. Fluka AG, Neu Ulm;
- 3.3.8 -Farbstofflösung für den Farbstoff (Dye) LASER:
 Rhodamin B 2C6100, Fa.Lambda Physik, Göttingen;
 Äthylenglykol p.A., Fa. E.Merck, Darmstadt;
 Methanol p.A., Fa.E.Merck, Darmstadt;
- 3.3.9 -Streumedium für integrale Bestrahlung:
 Intralipid 10 % Vitrum, Fa. Kabi Vitrum GmbH,
 München
 Kochsalzlösung 0,9 %

3.4 -Geräte und sonstige Materialien

3.4.1 -Zellzüchtung:

Kulturflaschen Costar Tissue Flask 3275 75 cm²
(275 ml);
Zentrifugenröhrchen Falcon 2070F;
Zentrifuge Hettich Rotana S;
Brutschrank Fa. Hereus Christ, Osterode,
37° C, 5 Vol % CO₂, 100 % rel. Luftfeuchtigkeit;
Steriler Arbeitsplatz Laminair Flow, Fa. CEAG,
Schirp Reinraumtechnik GmbH, Selm Bork Westf.;
Clay Adams Hematology Analyzer 5 zur Zellzählung

3.4.2 -Endoskope und Zubehör:

Zystoskope Charr. 13 und Charr. 15, Fa. K. Storz,
Tuttlingen; Zystoskope Sonderanfertigungen, W.
Dietz, Feinmechanische Werkstätten der Gesell-
schaft für Strahlen- und Umweltforschung m b H ,
München Neuherberg; Franzén Feinnadeln zur Trans-
plantation der Tumorzellen; Storz Kaltlichtquelle
593 T2, Fa.K. Storz, Tuttlingen; Storz Kaltlicht-
quelle und Computerblitzgerät 559, Fa. K. Storz,
Tuttlingen;

3.4.3

-Fotografische Dokumentation:

Contax RTS mit Objektiv Yashika Medical 100DX mit Ringblitz; Nikon F3 mit Zeiss Operationsmikroskop OPMI6; Filmkamera Beaulieu R16 Automatik;

3.4.4

-Messgeräte und Schreiber:

Fluoreszenz-Spektrometer Perkin Elmer 650-10S;
Spektrophotometer Beckmann UV 5230;
Schreiber W+W Rekorder 314;
Thermokamera AGA-Thermovision 750;
Photodiode Hewlett-Packard Pin Diode HP4207 mit Operationsverstärkerschaltung;

3.4.5

-LASER-Systeme und Bestrahlungszubehör:

Spektra-Physiks Argon-LASER 170;
Spektra-Physiks Dye-(Farbstoff-) LASER 375;
Spektra-Physiks Powermeter 404;
Coherent-Powermeter 201;
Lichtleiterankopplung, Sonderanfertigung W. Dietz, Feinmechanische Werkstätten der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung m b H München Neuherberg;
Lichtleiter Durchmesser 0,6 mm Quarzglas, Fibrop-sil, Quarz + Silice; Mattscheibe eigener Herstellung, Stärke 2 mm; LASER-Schutzbrillen nach DIN;

METHODIK

4.1

Herstellung und Verabreichung von HpD

Die Herstellung von HpD erfolgte zu Beginn der Experimente analog der unter Punkt 2.2 beschriebenen Methode von LIPSON (36, 37).

HpD wurde bis zur Verwendung bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Substanz wurde durch Vergleich der charakteristischen Fluoreszenz- und Absorptionsspektren mit den aus der Literatur ersichtlichen Daten spektrofluorometrisch und spektrometrisch hinsichtlich ihrer Identität überprüft. Die von der eigenen Arbeitsgruppe ermittelten Größen stimmten vollständig mit den von DOIRON und KINSEY beschriebenen Werten überein (11, 30) (siehe auch Punkt 2.2.3).

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde dann käuflich erworbenes und auf seine Wirksamkeit getestetes HpD verwendet. Die Injektion erfolgte bei Ratten anfangs intraperitoneal, in späteren Versuchen ausschließlich intravenös. Die intravenöse Injektion wurde bei der Ratte mittels einer 1 ml Insulinspritze und einer Kanüle 0,4 x 20 mm in die operativ freigelegte Vena saphena gespritzt. In allen Versuchen wurde HpD in einer Konzentration von 10 mg/kg KG parenteral verabreicht. Bei allen anderen Tieren wurde HpD ausschließlich intravenös in der jeweils speziesüblichen Weise und Dosierung in einer Konzentration von 5 mg/ml verabreicht.

4.2

Tumormodell - Rattenharnblase

4.2.1

Chemische Induktion von Blasenkarzinomen bei Ratten mit BBN

Für die experimentellen Untersuchungen an der Ratten-

harnblase stand als Tumormodell das chemisch induzierte Blasenkarzinom der Ratte zur Verfügung. Ein Vergleich des Spektrums dieser mit einem Nitrosamin (siehe unten) induzierten Tumoren mit dem menschlichen Blasenkarzinom zeigt, daß alle beim Menschen vertretenen histologischen Blasenkarzinomtypen auch bei der Ratte durch chemische Induktion erzeugbar sind (33). Tabelle 3 gibt eine vergleichende Übersicht über die prozentuale Verteilung histologischer Blasenkarzinomtypen bei Mensch und Ratte, aus der die weitgehende Übereinstimmung der Verteilung der Tumortypen ersichtlich ist.

Tab.3

	Mensch	Ratte*
Transitionalzellkarzinom	88,8 %	92,7 %
Plattenepithelkarzinom	5,1 %	2,8 %
Mischtyp	2,8 %	- - -
Adenokarzinom	2,2 %	2,0 %
undifferenzierte Karzinome	1.1 %	1.4 %

Je nach Verfügbarkeit wurden 2 Rattenstämme zur Tumorinduktion verwendet. Männlichen und weiblichen Long Evans Ratten und männlichen Wistar Ratten wurde das BBN** in einer Konzentration von 20 mg/kg KG täglich im Trinkwasser verabreicht. Nach einer Inkubationsdauer von 5-10 Monaten waren Tumoren vom Carcinoma in situ bis zum infiltrierenden Karzinom für Versuchszwecke vorhanden.

* chemisch induzierter Tumor

**N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)-Nitrosamin

Die Abbildungen 2 a und 2 b zeigen eröffnete Rattenblasen mit entsprechend unterschiedlichen Tumorstadien. Die Entwicklung von winzigen Tumoren zu fortschreitend ausgeprägten Tumoren ist deutlich zu erkennen.

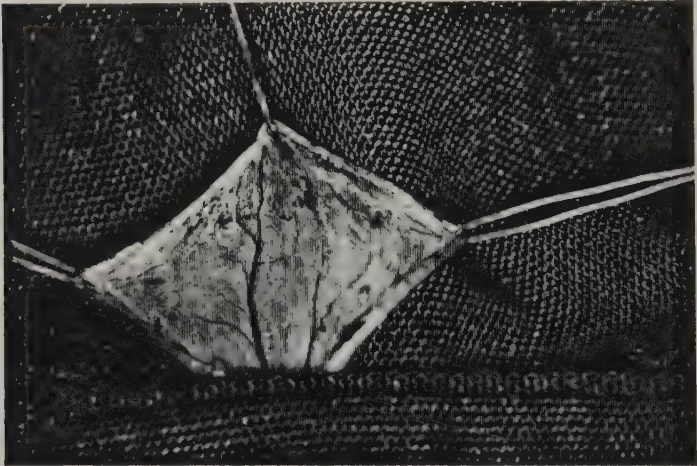


Abb. 2 a:
kleinste Blasentumoren der Ratte nach einer BBN-Inkubationszeit von 6 Monaten (histologisch gesamtes Urothel maligne verändert)



Abb. 2 b:
Blasentumoren der Ratte nach einer BBN-Inkubationszeit von 10 Monaten

4.2.2

Versuchsanordnung und Durchführung der zeilenförmigen
LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen

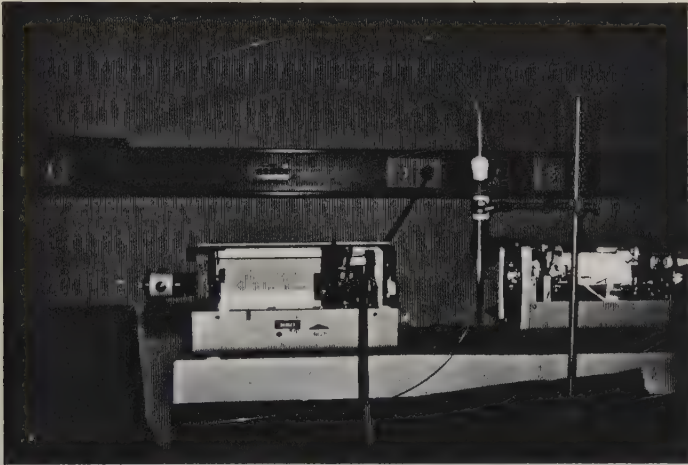


Abb. 3:
Farbstoff-LASER-System mit angekoppeltem Lichtleiter. Rechts im Bild ist der Argon Pump-LASER erkennbar, dessen blaues Licht im Farbstoff-LASER (Bildmitte) die Erzeugung roten LASER-Lichts anregt. Das rote LASER-Licht wird über einen Lichtleiter (oberer linker Bildrand) weitergeleitet.

Die Bestrahlung wurde nach Narkotisierung der Ratten in der nachfolgend beschriebenen Weise an der eröffneten Blase durchgeführt. Hierzu wurde die freigelegte Blase entlang der Blasenvorderwand vom Blasenhals bis zum Blasenscheitel eröffnet und mit chromiertem Catgut der Stärke 5/0 zu einer bestrahlbaren Fläche aufgespannt. Die Lichtleiterspitze wurde während der Bestrahlung von Hand im Abstand von 1-2 cm zeilenförmig über der Blase hin und her bewegt. Die Blase wurde während der Bestrahlung zur Kühlung und

zum Schutz der Schleimhaut gegen Austrocknung ständig mit physiologischer Kochsalzlösung gespült.

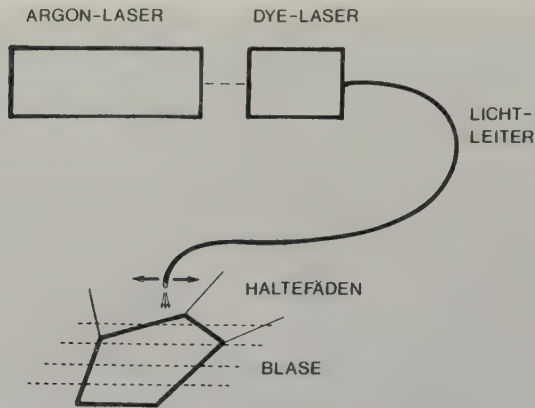


Abb. 4:
schematische Darstellung der zeilenförmigen LASER-
Bestrahlung

Abbildung 3 zeigt das bei der Bestrahlung verwendete LASER-System, Abbildung 4 gibt in einer schematischen Darstellung die Vorgänge bei der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Rattenblasen wieder. Nach der Bestrahlung erfolgte der Verschuß der Blase durch fortlaufende Naht. Die Operationswunde wurde anschließend schichtweise vernäht. Die Ratten wurden 3 Tage nach Bestrahlung mit Äther eingeschläfert. Die Blasen wurden unmittelbar anschließend entnommen und bis auf wenige Ausnahmen ohne großen Zug auf einen steifen Karton aufgespannt. Die Präparate wurden in 5 %igem Formalin eingelegt, in Plastiktüten eingeschweißt und zur histologischen Untersuchung gegeben.

4.2.2

Versuchsanordnung und Durchführung der zeilenförmigen
LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen

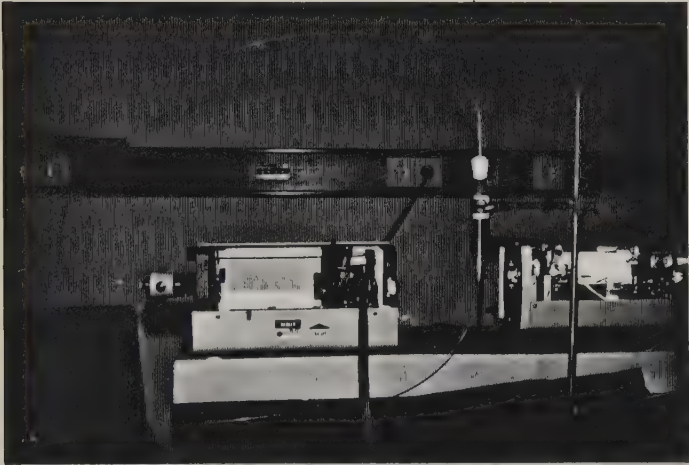


Abb. 3:
Farbstoff-LASER-System mit angekoppeltem Lichtleiter.
Rechts im Bild ist der Argon Pump-LASER erkennbar,
dessen blaues Licht im Farbstoff-LASER (Bildmitte) die
Erzeugung roten LASER-Lichts anregt. Das rote LASER-
Licht wird über einen Lichtleiter (oberer linker Bild-
rand) weitergeleitet.

Die Bestrahlung wurde nach Narkotisierung der Ratten in der nachfolgend beschriebenen Weise an der eröffneten Blase durchgeführt. Hierzu wurde die freigelegte Blase entlang der Blasenvorderwand vom Blasenhals bis zum Blasenscheitel eröffnet und mit chromiertem Catgut der Stärke 5/0 zu einer bestrahlbaren Fläche aufgespannt. Die Lichtleiterspitze wurde während der Bestrahlung von Hand im Abstand von 1-2 cm zeilenförmig über der Blase hin und her bewegt. Die Blase wurde während der Bestrahlung zur Kühlung und

zum Schutz der Schleimhaut gegen Austrocknung ständig mit physiologischer Kochsalzlösung gespült.

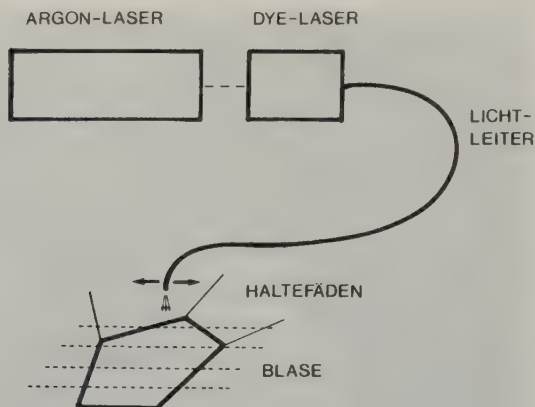


Abb. 4:
schematische Darstellung der zeilenförmigen LASER-
Bestrahlung

Abbildung 3 zeigt das bei der Bestrahlung verwendete LASER-System, Abbildung 4 gibt in einer schematischen Darstellung die Vorgänge bei der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Rattenblasen wieder. Nach der Bestrahlung erfolgte der Verschuß der Blase durch fortlaufende Naht. Die Operationswunde wurde anschließend schichtweise vernäht. Die Ratten wurden 3 Tage nach Bestrahlung mit Äther eingeschläfert. Die Blasen wurden unmittelbar anschließend entnommen und bis auf wenige Ausnahmen ohne großen Zug auf einen steifen Karton aufgespannt. Die Präparate wurden in 5 %igem Formalin eingelegt, in Plastiktüten eingeschweißt und zur histologischen Untersuchung gegeben.

4.2.2.1 Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung von Rattenblasen

Die Bestrahlungsdosis D bei der zeilenförmigen Bestrahlung von Rattenblasen konnte mangels geeigneter Messgeräte nur näherungsweise bestimmt werden. Die Bestrahlungsdosis wurde nach der Formel:

$$D = L \cdot t \cdot F^{-1},$$

bestimmt.

Hierin bedeuten: L = Gesamtleistung des LASERS (W)

t = Dauer der Bestrahlung (s)

F = Bestrahlungsfeldfläche (cm²)

Die manuelle, zeilenförmige überstreichende Bestrahlung der Rattenblasen führte zwangsläufig zu Abstandsschwankungen und ungleichmäßiger Applikation des LASER-Lichts. Dosisschwankungen, die sich hieraus ergaben, mußten vernachlässigt werden.

4.2.2.2 Zeilenförmige LASER-Bestrahlung der Rattenblasen

4.2.2.2.1 Versuche zur zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Rattenblase nach intraperitonealer Injektion von HpD

Nach einer 12 monatigen Tumorinduktionszeit mit BBN wurden 18 Ratten mit HpD photosensibilisiert und mit LASER-Licht bestrahlt. Die Verabreichung von HpD er-

folgte intraperitoneal in einer Dosierung von 10 mg/Kg KG nach der unter Punkt 4.1 beschriebenen Methode.

Nach einer HpD-Inkubationszeit von 36 h - 76 h, durchschnittlich 52 h, wurden die Tiere wie unter Punkt 4.2.2 beschrieben zur Behandlung vorbereitet und mit einer Dosis von 12 J/cm^2 - 600 J/cm^2 , durchschnittlich 150 J/cm^2 , zeilenförmig bestrahlt.

Die Blasen wurden zwischen 3 und 10 Tagen nach Behandlung entnommen und im Pathologischen Institut der Universität München histologisch untersucht.

4.2.2.2.2 Versuche zur zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Rattenblase nach intravenöser Injektion von HpD

Nach 9 bis 12 monatiger Tumorinduktion mit BBN wurden 15 Ratten in der gleichen Weise wie in der vorhergehenden Versuchsgruppe bestrahlt (siehe auch Punkt 4.2.2). Diesmal erfolgte die HpD-Injektion nach der unter Punkt 4.1 beschriebenen Methode intravenös in einer Dosierung von ebenfalls 10 mg/Kg KG.

Nach einer Inkubationszeit von 19 h - 169 h, durchschnittlich 82 h, wurden die Blasen mit Bestrahlungsdosen von 180 J/cm^2 bis 1440 J/cm^2 , durchschnittlich 530 J/cm^2 , bestrahlt. Die Obduktion der Tiere wurde 3 Tage nach der Bestrahlung durchgeführt. Die Präparate wurden wiederum der histologischen Begutachtung zugeleitet.

4.2.2.2.2.1 Vergleiche zwischen Bestrahlungsversuchen nach intraperitonealer und intravenöser Verabreichung von HpD

5 Ratten der in der letzten Gruppe nach intravenöser Verabreichung von HpD bestrahlten 15 Ratten

wurden gesondert betrachtet (Gruppe 4.2.2.2.2) und mit 5 Ratten der Gruppe 4.2.2.2.1 (intraperitoneale Verabreichung von HpD) verglichen. Die Tiere waren so ausgewählt worden, daß sich die Versuchsbedingungen, abgesehen von der HpD-Injektionsart, etwa entsprachen.

5 Ratten waren nach intravenöser Verabreichung von HpD mit einer Dosis von 180 J/cm^2 - 288 J/cm^2 , durchschnittlich 250 J/cm^2 , bestrahlt worden.

Die HpD-Inkubationszeit lag zwischen 64 h und 169 h und betrug im Mittel 105 h.

5 Ratten waren nach intraperitonealer HpD-Injektion mit einer Dosis von 150 J/cm^2 bis ca 450 J/cm^2 , durchschnittlich 300 J/cm^2 , bestrahlt worden. Die HpD-Inkubationszeit lag zwischen 36 h und 72 h und betrug im Mittel 48 h. HpD war in beiden Gruppen in einer Dosierung von 10 mg/Kg KG gegeben worden.

4.2.2.2.2.2 Bestrahlungseffekte nach intravenöser Verabreichung von HpD im Hinblick auf unterschiedliche HpD-Inkubationszeiten

Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der Therapie von unterschiedlichen HpD-Inkubationszeiten wurden die Bestrahlungen in zwei Gruppen mit verschiedenen langen HpD-Inkubationszeiten durchgeführt. 11 Tiere wurden nach einer Inkubationszeit von 19 h - 78 h bestrahlt, durchschnittlich 58 h; 4 Tiere wurden nach einer Inkubationszeit von 118 h - 169 h, durchschnittlich 133 h, bestrahlt. Die LASER-Bestrahlung wurde zeilenförmig durchgeführt. Die übrigen Parameter der Versuchsdurchführung blieben unverändert.

4.2.2.2.3 Kontrollversuche: zeilenförmige LASER-Bestrahlung der Rattenharnblase ohne Photosensibilisierung

4.2.2.2.3.1 LASER-Bestrahlung nicht mit HpD photosensibilisierter Rattenblasentumoren

5 Rattenblasen wurden nach 12 - 14 monatiger Tumorentstehung mit BBN ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD zeilenförmig überstreichend bestrahlt. Hierbei sollte beobachtet werden, inwieweit die alleinige LASER-Bestrahlung zu einer Tumorreduktion führen kann. Die Bestrahlung erfolgte mit Dosen zwischen 300 J/cm^2 und 600 J/cm^2 , im Mittel 430 J/cm^2 . Die Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei den vorhergehenden Versuchen durchgeführt (siehe auch Punkt 4.2.2).

4.2.2.2.3.2 LASER-Bestrahlung nicht photosensibilisierter tumorfreier Rattenblasen mit verschiedenen Bestrahlungsdosen

In diesem Teil des Versuchsprogramms wurde die Wirkung unterschiedlicher Bestrahlungsdosen des LASER-Lichts auf gesundes Blasenschleimhautgewebe untersucht. Bestrahlt wurden 17 Rattenblasen. Die Versuche wurden in 5 Gruppen mit ansteigenden Bestrahlungsdosen durchgeführt. Die Bestrahlungsdosen in den einzelnen Gruppen betrugen wie folgt:

Gruppe 1	60 - 180 J/cm^2
Gruppe 2	240 - 282 J/cm^2
Gruppe 3	400 - 480 J/cm^2
Gruppe 4	533 - 738 J/cm^2
Gruppe 5	1000 - 1200 J/cm^2

Die Bestrahlungen wurden in der für die zeilenförmige Bestrahlung üblichen Weise durchgeführt (vergleiche Punkt 4.2.2).

4.2.3

Versuchsanordnung und Durchführung der homogenen
LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen

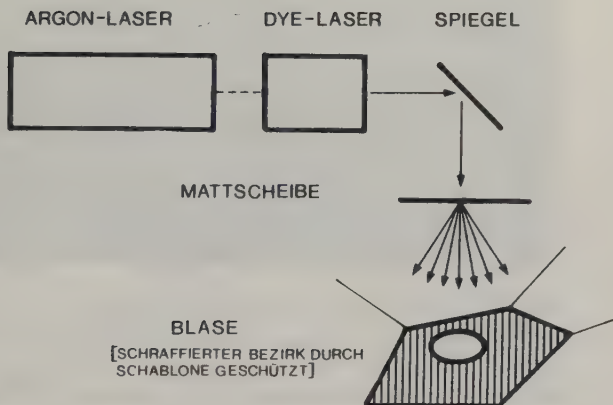


Abb. 5:
schematische Darstellung der homogenen LASER-Bestrahlung

Die Vorbereitung der Tiere zur Bestrahlung erfolgte wie bei den vorhergehenden Versuchen. Anstelle der zeilenförmigen Bestrahlung wurde nun eine homogene LASER-Bestrahlung durchgeführt. Bestrahlt wurden gesunde und tumortragende Tiere mit LASER-Licht, welches durch eine Mattscheibe gestreut wurde. Durch die Streuung des LASER-Lichtes an der Mattscheibe konnte eine gleichmäßige Verteilung der Lichtintensität erreicht werden. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der homogenen Bestrahlung von Rattenblasen.

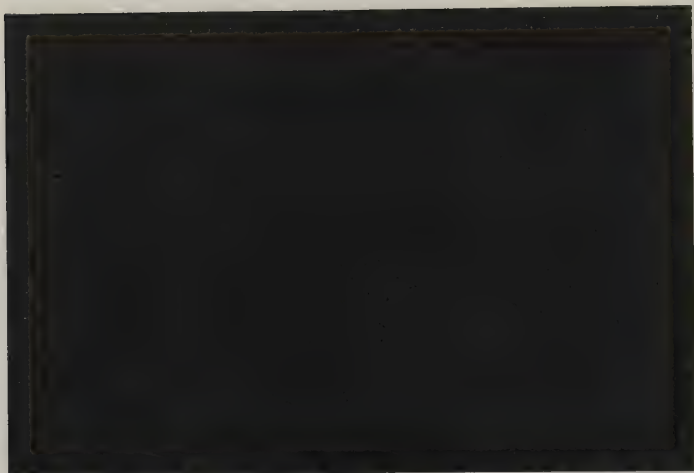


Abb. 6: homogene LASER-Bestrahlung einer Rattenblase: die Rattenblase ist von einer Schablone abgedeckt. Das zur Kühlung verwendete Kochsalz fließt in einem dünnen Strahl in das Bestrahlungsfeld. Man beachte die homogene Ausleuchtung des Bestrahlungsfeldes.

In eine Schablone aus dünner Aluminiumfolie wurde ein Loch von der Größe des Bestrahlungsbezirks gestanzt. Die Schablone wurde den Konturen der aufgespannten Blase entsprechend zurechtgeschnitten. Die Blase wurde während der Bestrahlung mit dieser Schablone abgedeckt. Auch bei der homogenen Bestrahlung wurde die Blase mit physiologischer Kochsalzlösung zum Schutz vor Austrocknung und zur Kühlung gespült.

In Abbildung 6 ist die homogene Lichtverteilung im Bestrahlungsfeld während der Bestrahlung erkennbar. Die restliche Blase ist durch eine Schablone abgedeckt. Auf der Fotografie ist außerdem die zur Kühlung in einem dünnen Strahl auf das Bestrahlungsfeld fließende Kochsalzlösung erkennbar. Der Bezirk wurde nach Bestrahlung durch einen Faden markiert, um das Bestrahlungsareal bei der histologischen Aufarbeitung der Blase wiederfinden zu können.

Abbildung 7 zeigt die mit einer Photodiode gemessene, unterschiedliche Streulichtverteilung des LASER-Lichts mit und ohne Streuung an einer Mattscheibe.

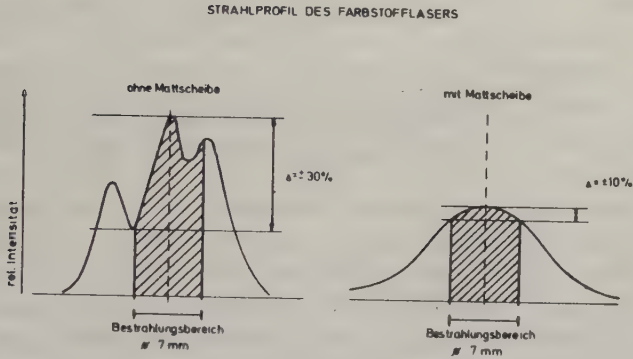


Abb. 7:
unterschiedliche Intensitätsverteilung des LASER-Lichts im Bestrahlungsareal ohne und mit Streuung des LASER-Strahls an einer Mattscheibe

Der Vergleich der Intensitätsverteilung des LASER-Lichtes mit und ohne Homogenisierung durch Streuung an einer Mattscheibe zeigt deutlich eine homogenere Verteilung der Intensität des LASER-Lichtes im Bestrahlungsbereich lediglich nach Streuung durch eine Mattscheibe. Ebenso ist erkennbar, daß die Streuung des Lichtes durch eine Mattscheibe dem Gaußschen Verteilungsgesetz entspricht. Der Bestrahlungsbezirk wurde so groß gewählt, daß das auf ihn fallende Licht bei geringen Intensitätsschwankungen von maximal $\pm 10\%$ als homogen angesehen werden konnte.

4.2.3.1

Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei homogener LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen

Zur Bestimmung der Lichtintensität und der Bestrahlungsdosis wurde das durch die Mattscheibe gestreute Licht mit einer Photodiode vermessen. Die Diode wurde mit bekannter und gleichmäßiger Geschwindigkeit parallel und in konstantem Abstand zur Mattscheibe durch das vom Streulicht beleuchtete Bestrahlungsareal bewegt.

Abbildung 8 zeigt in einer schematischen Darstellung den Vorgang der Bestimmung der Intensitätsverteilung des Streulichtes im Bestrahlungsfeld.

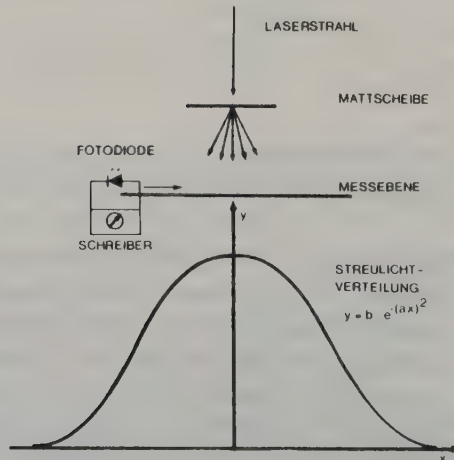


Abb. 8:
schematische Darstellung der Bestimmung der Intensitätsverteilung des Streulichtes

Da flächenhaft messende Photodioden nicht zur Verfügung standen, konnte der auf das Bestrahlungsfeld fallende LASER-Lichtanteil nur mit Hilfe mathematischer Überlegungen ermittelt werden. Die wesentlichen Gedanken werden hier zum besseren Verständniss des Formelteils kurz skizziert:

Projiziert man das durch eine Mattscheibe gestreute LASER-Licht auf eine Ebene, so entsteht der Eindruck eines kreisrunden Lichtflecks, dessen Intensität im Zentrum am größten ist und zum Rand hin abnimmt. Sinnvollerweise misst man die Intensität über diesem Fleck längs seines Durchmessers. Hierzu wird eine punktförmig messende Photodiode verwendet. Die Signale werden mit einem Schreiber registriert. Es resultiert eine der Gausschen Kurve entsprechende Funktion $f(x)$ (siehe Abb. 8). Misst man über jedem Punkt des Lichtflecks, erhält man einen Volumenkörper, dessen Oberfläche der Oberfläche einer Glocke entspricht. Das Volumen V_g dieser Glocke repräsentiert die gesamte LASER-Lichtleistung, die nach der Streuung hinter der Mattscheibe messbar ist. Der Anteil des LASER-Lichts, der auf das kreisförmige Bestrahlungsfeld im Zentrum des Lichtflecks fällt, entspricht einem zylinderförmigen Ausschnitt mit dem Volumen V_z der Glockenkurve (Abb. 9b). Dieser Ausschnitt läßt sich als prozentualer Anteil A am Gesamtvolumen der Glocke ausdrücken.

$$A(\%) = \frac{100V_z}{V_g};$$

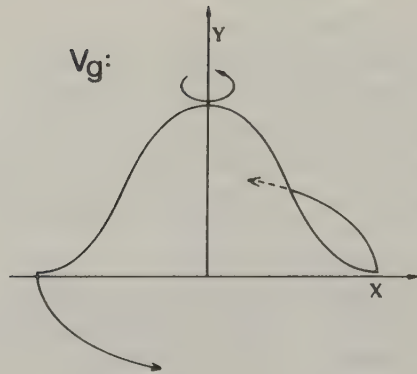


Abb. 9 a:
Entstehung der Glockenkurve V_g durch Rotation der
Gausskurve um die Y - Achse

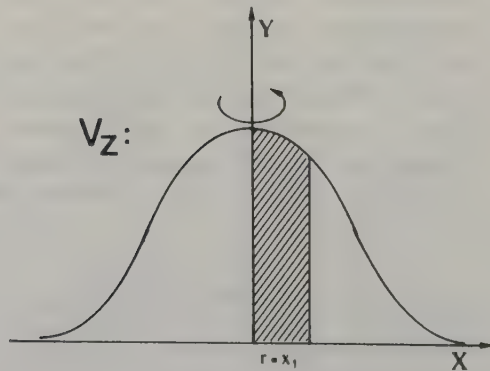


Abb. 9 b:
Entstehung des Zylinderausschnitts V_z durch Rotation
der schraffierten Fläche um die Y - Achse

Folgende Grössen sind zur Berechnung des Anteils A notwendig:

1.) Der mathematische Ausdruck für das Volumen V_g der Glocke.

Rechnerisch erhält man diese Formel, indem man die Funktion $f(x)$ um die y -Achse rotieren lässt und das Integral der durch die Rotation entstehenden Kurve $f'(x)$ bildet. (siehe Abb.9a)

Die allgemeine Gleichung der Gausskurve lautet:

$$f(x): y = b e^{-(ax)^2};$$

(a und b sind allgemeine Parameter der Kurve, b entspricht der Höhe der Kurve, a bestimmt die Spreizung des Kurvenbildes)

Die Gleichung der zugehörigen Rotationskurve lautet:

$$f'(x): y = b e^{-\frac{a^2 x^2}{\pi}};$$

Das von der Funktion $f'(x)$ glockenförmig eingeschlossene Volumen V_g gehorcht dann der Gleichung:

$$V_g = \int_0^{\infty} b e^{-\frac{a^2 x^2}{\pi}} dx ;$$

$$V_g = \frac{b \pi}{a^2};$$

2.) Der mathematische Ausdruck für das Volumen V_z der Glocke:

Dieser lässt sich als das Integral der Kurve $f'(x)$ in den Grenzen 0 und $r = x_1$ bestimmen.

Der zylindrische Ausschnitt V_z lässt sich durch die Gleichung:

$$V_z = \int_0^{x_1} b e^{-\frac{a^2 x}{\tau}} dx;$$

beschreiben.

Abbildung 9b verdeutlicht den durch Rotation der schraffierten Fläche entstehenden zylindrischen Körper V_z

x_1 entspricht in der Kurve dem Radius des Bestrahlungsfeldes.

Für den Radius $r = x_1$ gilt nach Rotation um die y Achse:

$$r' = x;$$

x stellt die durch die Rotation notwendig gewordene neue Integrationsgrenze dar und gehorcht der Beziehung:

$$x = x_1^2 \tau;$$

Daraus ergibt sich durch Einsetzen der neuen Integrationsgrenze x in V_z die Gleichung:

$$V_z = \frac{b \tau}{a^2} (-e^{-(ax_1)^2} + 1) ;$$

3.) Der Parameter a der Funktionen V_g und V_z :

Der Parameter a ist eine allgemeine Größe der Funktion die über die Weite oder Spreizung des Kurvenbildes entscheidet. Er läßt sich wie folgt aus dem Graphen der Funktion $f(x)$ ermitteln:

für die Wendepunkte x_w und y_w einer Gausskurve gilt allgemein:

$$\text{I) } y_w = b \frac{1}{\sqrt{e}}; \quad \text{II) } x_w = \frac{1}{a\sqrt{2}};$$

Der Parameter b ist identisch mit der Höhe der Kurve und läßt sich graphisch aus der Kurve bestimmen; nun läßt sich y_w errechnen; bei Kenntnis von y_w läßt sich x_w graphisch als die zum Wendepunkt der Gausskurve zugehörige x Koordinate bestimmen. Bei Kenntnis von x_w kann man a aus der Formel II) durch Auflösen der Formel II) nach a gewinnen:

$$a = \frac{1}{x_w \sqrt{2}};$$

Für den prozentualen Anteil A von V_z am Gesamtvolumen V_g gilt dann:

$$A(\%) = \frac{100 V_z}{V_g} = 100 (-e^{-\frac{(ax_1)^2}{2}} + 1);$$

Dieser läßt sich nun nach der Berechnung des Parameters a und nach Einsetzen der Werte für a und den Radius x_1 des Bestrahlungsfeldes in die Gleichung $A(\%)$; leicht errechnen. Durch Anwendung der Beziehung

$$A(\%) = 100 (-e^{-\frac{(ax_1)^2}{2}} + 1);$$

läßt sich in Abhängigkeit vom Radius $r = x_1$, der auf das Bestrahlungsfeld fallende prozentuale Anteil A an der Gesamtleistung des LASER-Lichts bestimmen.

Die Größe des Bestrahlungsbereichs wurde bei den Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe so gewählt, daß die maximale Intensitätsdifferenz $\pm 10 \%$ betrug. Der Radius des Bestrahlungsfelds konnte durch einfache geometrische Überlegungen aus der Kurve der Streulichtverteilung der Mattscheibe ermittelt werden. Unter Berücksichtigung des Maßstabes, mit dem der Schreiber den Kurvenverlauf aufzeichnet, kann der Radius r auf die tatsächliche Größe rekonstruiert werden.

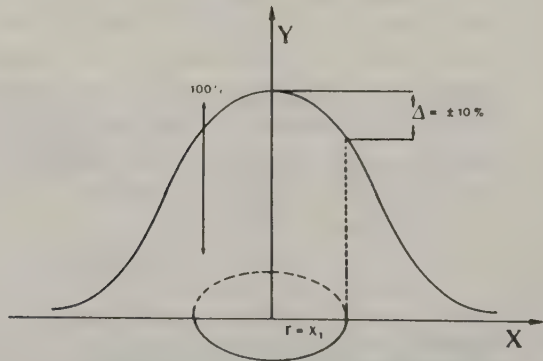


Abb. 10:
geometrische Ermittlung des Bestrahlungsbereichs

Abbildung 10 zeigt, wie sich der Bestrahlungsbereich in Abhängigkeit von einer Intensitätsschwankung von $\pm 10 \%$ aus der Kurve ermitteln läßt.

Der auf das Bestrahlungsfeld fallende Lichtanteil kann als prozentualer Anteil am LASER-Licht nach dessen Streuung an der Mattscheibe angegeben werden.

Die LASER-Leistung nach Streuung durch die Mattscheibe wird durch die LASER-Ausgangsleistung und die Transmission der Mattscheibe bestimmt.

Die Transmission T der zur Streuung verwendeten Mattscheibe wurde durch Messung mit den beschriebenen Powermetern und der Photodiode bestimmt. T wurde als prozentualer Anteil an der Gesamtleistung des LASERS angegeben. Die Bestrahlungsdosis D konnte dann aus folgender Gleichung bestimmt werden:

$$D(J/cm^2) = L A T t F^{-1} ;$$

Hierin bedeuten:

L = Gesamtleistung des LASERS (W)

A = Anteil des auf das Bestrahlungsfeld fallenden Lichts (%)

T = Transmission (%)

t = Dauer der Bestrahlung (s)

F = Fläche des Bestrahlungsfelds (cm²)

4.2.3.2 Übersicht über die Versuche zur homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenblasen

4.2.3.2.1 Homogene LASER-Bestrahlung von Rattenblasen mit nicht infiltrierend wachsenden Tumoren

In dieser Versuchsserie wurden tumortragende Rattenblasen mit nicht infiltrierendem Tumorstadium nach vorheriger Photosensibilisierung durch HpD homogen bestrahlt. Die Tumorstadiumszeit mit BBN betrug bei diesen Versuchen ca. 6 Monate. Nach dieser verhältnismäßig kurzen BBN-Inkubationszeit bestätigte die histologische Kontrolluntersuchung ein nicht infiltratives Wachstum der Tumoren. Insgesamt wurden 13 Ratten mit Harnblasenkarzinomen nicht infiltrativen Wachstums mit homogenem LASER-Licht bestrahlt.

4.2.3.2.1.1 Homogene LASER-Bestrahlung nicht infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 17 h HpD-Inkubationszeit

8 Rattenblasen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 16 h - 19 h, durchschnittlich 17 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt (siehe Punkt 4.2.3).

Die Bestrahlungsdosis variierte von 120 - 150 J/cm², und betrug im Mittel 139 J/cm².

Die Durchführung der Versuche erfolgte nach der unter Punkt 4.2.3 beschriebenen Methode.

4.2.3.2.1.2 Homogene LASER-Bestrahlung nicht infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 55 h HpD-Inkubationszeit

Bei 5 Tieren, deren Blasentumoren die gleichen Stadien wie die der vorhergehenden Gruppe aufwiesen, wurde die LASER-Bestrahlung nach einer HpD-Inkubationszeit von 55 h vorgenommen. Die Bestrahlungsdosis betrug einheitlich 150 J/cm^2 .

Auch in dieser Versuchsreihe entsprachen die Versuchsbedingungen der unter Punkt 4.2.3 beschriebenen Methodik.

4.2.3.2.2 Homogene LASER-Bestrahlung von Rattenblasen mit infiltrierend wachsenden Tumoren

In dieser Versuchserie wurden tumortragende Rattenblasen mit beginnender oder auch schon stärkerer Infiltration der Tumoren behandelt. Die Tumorinduktionszeit innerhalb dieser Serie betrug etwa 10 Monate. In allen Fällen wurde eine vorhergehende Photosensibilisierung mit HpD durchgeführt. Insgesamt wurden 17 Tiere nach entweder 17 h oder 55 h HpD-Inkubationszeit behandelt. Die Bestrahlungsdosen betrugen entweder 30 J/cm^2 oder 150 J/cm^2 .

Die Bestrahlungsanordnung wurde genauso gehalten wie unter Punkt 4.2.3 beschrieben.

4.2.3.2.2.1 Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 17 h HpD Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm^2

3 Rattenblasen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 17 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug einheitlich 30 J/cm^2

4.2.3.2.2.2 Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 17 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm²

7 Rattenblasen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 17 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug hier 150 J/cm². Die Bestrahlungsform wurde analog zu den vorhergehenden Versuchen gehalten.

4.2.3.2.2.3 Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 55 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm²

3 Rattenblasen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 55 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug 30 J/cm². Die Versuchsbedingungen blieben ansonsten unverändert.

4.2.3.2.2.4 Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Blasentumoren nach 55 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm²

4 Rattenblasen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 55h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug einheitlich 150 J/cm². Versuchsbedingungen siehe Punkt 4.2.3 .

4.2.3.2.3 Kontrollversuche zur homogenen Bestrahlung von Rattenblasen

3 Kontrollversuchsserien wurden durchgeführt.
Es wurden:

- 1.) 8 tumortragende Rattenharnblasen ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD bestrahlt.

- 2.) 15 tumorfremie Rattenharnblasen nach vorheriger Photosensibilisierung mit HpD und ansteigenden HpD-Inkubationszeiten mit konstanter Bestrahlungsdosis bestrahlt.
- 3.) 12 tumorfremie Rattenharnblasen ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD mit ansteigenden Bestrahlungsdosen bestrahlt. Die Versuche wurden zu den gleichen Bedingungen wie unter Punkt 4.2.3 beschrieben durchgeföhrt.

4.2.3.2.3.1 Bestrahlung tumortragender Rattenblasen ohne Photosensibilisierung mit HpD, Bestrahlungsdosis 260 J/cm²

Bei 8 Ratten wurden tumortragende Harnblasen ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD bestrahlt. Die Bestrahlungsdosen lagen zwischen Werten von 225 J/cm² - 270 J/cm², durchschnittlich 259 J/cm².

4.2.3.2.3.2 Bestrahlung tumorfremier Rattenblasen, HpD-Inkubationszeiten von 30 min - 48 h

In dieser Versuchsreihe wurden in 5 Gruppen je 3 tumorfremie Rattenblasen mit einer konstanten Bestrahlungsdosis von 120 J/cm² homogen bestrahlt.

Die HpD-Inkubationszeiten wurden ansteigend gewöhlt und betrugen:

- Gruppe 1: 30 min
- Gruppe 2: 6 h
- Gruppe 3: 12 h
- Gruppe 4: 24 h
- Gruppe 5: 48 h

4.2.3.2.3.3 Bestrahlung tumorfreier Rattenblasen ohne Photosensibilisierung mit HpD, Bestrahlungsdosen ansteigend von 50 J/cm² - 700 J/cm²

In dieser Versuchsserie wurden in 4 Gruppen je 3 tumorfreie Blasen homogen mit LASER-Licht bestrahlt. Die Bestrahlungsdosen waren innerhalb der einzelnen Gruppen konstant:

Gruppe 1: 50 J/cm²

Gruppe 2: 150 J/cm²

Gruppe 3: 350 J/cm²

Gruppe 4: 700 J/cm²

4.3 Tumormodell - Brown-Pearce-Transplantattumor der Kaninchenharnblase

4.3.1 Züchtung und Transplantation von Brown-Pearce Tumorzellen

Bei Brown-Pearce-Tumorzellen handelte es sich ursprünglich um anaplastische Karzinomzellen aus dem Bereich einer vernarbten, aller Wahrscheinlichkeit nach Syphilis-bedingten Läsion des Kaninchenhodens. Diese Tumoren wurden erstmals von W.H.BROWN und L.PEARCE beschrieben (5).

Stammtumorzellen wurden uns freundlicherweise von der Fa. Hoechst Frankfurt/M zur Verfügung gestellt. Sie wurden in einem Kulturmedium folgender Zusammensetzung gezüchtet:

Kulturmedium:

- 100 ml Medium (RPMI)
- 20 ml FCS (foetales Kälberserum)
- 1 ml Penicillin/Streptomycin
- 2.5 ml NaHCO_3 (Bicarbonat)

Die zur Transplantation benötigten Zellen wurden mit einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig vom Boden der Kulturflaschen abgespült, 15 min bei etwa 3000 Umdrehungen/min abzentrifugiert und mit Hankscher Lösung auf eine Zelldichte von $1 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Die Vitalitätstestung erfolgte mittels Trypanblaufärbung. Alle Arbeiten, die Zellzüchtung und Zellsuspensionherstellung betreffend, wurden unter sterilen Bedingungen unter einem Lamin Air Flow durchgeführt.

Die Transplantation der Zellsuspension in die Blasenwand wurde nach der von HARZMANN und Mitarbeitern beschriebenen Methode durchgeführt (23). Hierbei wurde unter endoskopischer Sichtkontrolle die Harnblasenschleimhaut mit einer Franzén-Feinnadel mehrmals skarifiziert, bevor die Injektion der Tumorsuspension in die Mukosa und Submukosa erfolgte. Insgesamt wurden bei 60 Kaninchen endoskopisch Tumoren gesetzt. Das Tumorstadium wurde nach 5 Tagen, d.h. zum Zeitpunkt der Bestrahlung kontrolliert. 50 % aller Tumoren wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits spontane Nekrosen auf. In 76 % der Fälle konnte ein positiver Tumorbefund erhoben werden, in 18 % war ein Tumor nicht eindeutig nachweisbar, in 6 % zeigte die Schleimhaut keinerlei Veränderungen, welche auf ein Tumorstadium hätten schließen lassen.

4.3.2

Versuchsanordnung und Durchführung der zeilenförmigen
LASER-Bestrahlung von Kaninchenblasen

Die zeilenförmige Bestrahlung der Kaninchenblasen wurde analog der zeilenförmigen Bestrahlung der Rattenblasen durchgeführt. Die Blasen wurden nach operativer Freilegung vom Hals bis zum Scheitel entlang dem Blasenboden eröffnet und zur Bestrahlung mit chromierten Catgutfäden der Stärke 3/0 aufgespannt. Während der Bestrahlung wurden die Blasen ebenfalls mit isotoner Kochsalzlösung gespült. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden die Blase und die Bauchdecke mit fortlaufender Naht gesondert und schichtweise verschlossen. 4 Tage nach der Bestrahlung wurden die Tiere eingeschläfert. Die Blasen wurden entnommen und zur histologischen Begutachtung gegeben.

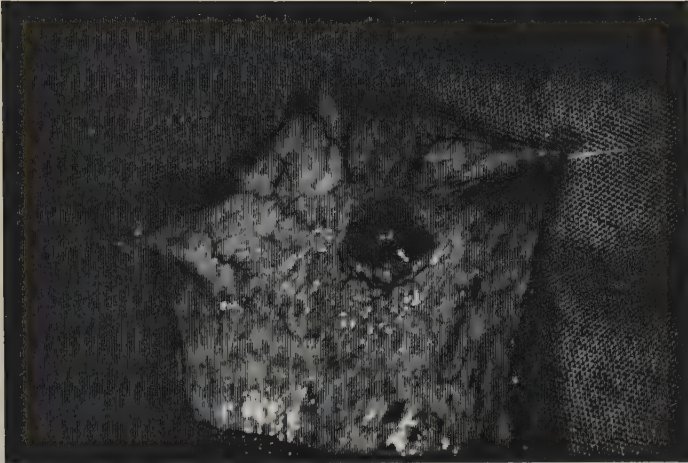


Abb. 11a:
intakter Brown-Pearce Tumor der Kaninchenharnblase



Abb. 11b:
zentral nekrotischer Brown-Pearce Tumor der
Kaninchenharnblase

4.3.2.1 Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei der zeilenförmigen
LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen

Die Bestrahlungsdosis bei der zeilenförmigen Bestrahlung von Kaninchenblasen wurde analog der in Punkt 4.2.2.1 beschriebenen Weise ermittelt.

4.3.2.2 Übersicht über die Versuche zur zeilenförmigen LASER-
Bestrahlung der Kaninchenblasen

Insgesamt wurden 3 Versuchsreihen zur zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Kaninchenblasen durchgeführt:

- 1.) Die Bestrahlung tumortragender Kaninchenblasen nach einer HpD-Inkubationszeit von 45 h;
- 2.) Die Bestrahlung tumortragender Kaninchenblasen nach einer HpD-Inkubationszeit von 68 h;
- 3.) Die Bestrahlung tumortragender Kaninchenblasen nach zweimaliger HpD-Gabe und einer HpD-Inkubationszeit von zuletzt 21 h;

4.3.2.2.1 Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen, HpD-
Inkubationszeit im Mittel 45 h, Bestrahlungsdosis im
Mittel 81 J/cm^2

Bei 9 Kaninchen wurden in der unter Punkt 4.3.1 beschriebenen Weise Tumoren in die Blase gesetzt. Die Tiere wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 41 h - 48 h, im Mittel 45 h, mit Bestrahlungsdosen von 29 J/cm^2 - 160 J/cm^2 zeilenförmig mit LASER-Licht bestrahlt.

4.3.2.2.2 Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen, HpD-Inkubationszeit im Mittel 68 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 56 J/cm²

6 Tiere wurden nach Transplantation in bereits beschriebener Weise zeilenförmig bestrahlt. Die HpD-Inkubationszeit variierte von 58 h bis 72 h, im Mittel 68 h. Die Bestrahlungsdosis lag zwischen 27 J/cm² und 90 J/cm², durchschnittlich 56 J/cm².

4.3.2.2.3 Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen nach zweimaliger Gabe von HpD, letzte HpD-Inkubationszeit im Mittel 21 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 80 J/cm²

6 Tieren wurde vor der Behandlung zweimal HpD verabreicht. Das erste Mal zwischen 27 h und 77 h vor Bestrahlung, durchschnittlich 52 h, das zweite Mal zwischen 7 h und 46 h, im Durchschnitt 21 h. Die Bestrahlungsdosen variierten von 27 J/cm² bis 148 J/cm², im Durchschnitt 80 J/cm².

4.3.3 Versuchsanordnung und Durchführung der integralen LASER-Bestrahlung von Kaninchenblasen

Die integrale Bestrahlung der Kaninchenblase wurde an der geschlossenen Blase transurethral vorgenommen. Hierzu wurde der Lichtleiter über den Arbeitseinsatz eines Kinderzystoskops Charr. 13 in die Blase eingeführt. Über die Spülkanäle des in Abbildung 12 gezeigten Zystoskops konnte als Spülflüssigkeit Kochsalzlösung und das spezielle Streumedium in die Blase gebracht werden.

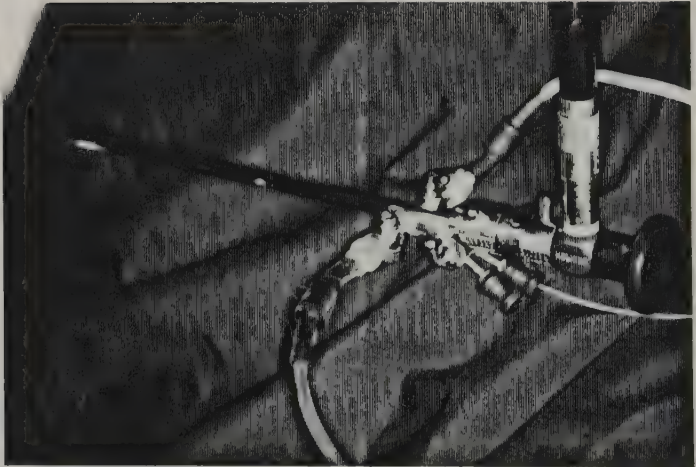


Abb. 12:
endoskopisches System zur integralen LASER-Bestrahlung. Über die Arbeitseinsätze sind die Zuleitungen für das Streumedium, die Spülflüssigkeit und der Lichtleiter eingeführt. Die Spitze des Lichtleiters und das Leuchten des LASER-Lichts sind an der Spitze des Zystoskops erkennbar.

Das Streumedium, eine Fettemulsion, die in der Klinik zur parenteralen Ernährung verwendet wird, wurde im Verhältnis 1:5 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Die Lichtleiterspitze wurde während der Bestrahlung unter endoskopischer Kontrolle durch Halten des Zystoskopes mit der Hand möglichst zentral in der Blase platziert. Auf diese Weise wurde versucht, einen Kontakt mit der Schleimhaut oder die Perforation derselben zu vermeiden. Zur Kühlung durchfloß das Streumedium langsam die gefüllte Blase. Mit einem Infusionsbesteck wurde der Durchfluß so gesteuert, daß über das Zystoskop ebensoviel Streumedium in die Blase hineinfloß, wie seitlich zwischen Harnröhre und Zystoskop wieder herausfließen konnte. Auf diese Weise konnte ein etwa gleicher Füllungszustand der Harnblase erreicht werden. Detrusorspasmen, die nach Überschreiten eines bestimmten Füllungszustandes zur teilweisen Entleerung der Blase führten, konnten nicht immer vermieden werden, und bedingten in Einzelfällen einen punktförmigen Kontakt des Lichtleiters mit der Schleimhaut. Die Bestrahlung konnte jedoch üblicherweise nach Erreichen des ursprünglichen Füllungszustandes ungehindert fortgesetzt werden.

4.3.3.1

Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei integraler LASER-Bestrahlung von Kaninchenblasen

Zur Ermittlung der Bestrahlungsdosis bei der integralen Bestrahlung von Kaninchenblasen mittels eines Streumediums mußte zuerst die Fläche F der Kaninchenblase bestimmt werden. Diese konnte aus dem bekannten Füllungsvolumen V der Blase mit der Formel:

$$F = 4,8 \cdot V^{0,66},$$

näherungsweise kalkuliert werden.

Für die Berechnung der erforderlichen LASER-Leistung zur Erzielung einer bestimmten Bestrahlungsdosis wurde als nächstes die Absorption der LASER-Leistung im Volumen des Streumediums in Abhängigkeit von dessen jeweils verwendeter Konzentration bestimmt. Hierzu wurde die vom Streumedium absorbierte und in Wärmeenergie umgewandelte Lichtenergie kalorimetrisch gemessen, und der absorbierte Anteil prozentual als Absorption A angegeben. Für die Transmission T gilt dann:

$$T = 100 - A ;$$

Die Bestrahlungsdosis D konnte dann nach folgender Formel bestimmt werden:

$$D = L T F^{-1} t ;$$

Hierin bedeuten: L = Gesamtleistung des LASERS (W)

T = Transmission (%)

t = Dauer der Bestrahlung (s)

F = Fläche des Bestrahlungsfelds (cm²)

4.3.3.2 Übersicht über die Versuche zur integralen LASER-Bestrahlung der Kaninchenblase

11 Kaninchen wurden nach erfolgter Tumortransplantation endoskopisch integral bestrahlt. Alle 11 Kaninchen wurden vor Bestrahlung einer endoskopischen Tumorkontrolle unterzogen und hatten makroskopisch erkennbare Tumoren. Die Bestrahlung erfolgte nach der unter Punkt 4.3.3 beschriebenen Methode. Die Bestrahlungsdosis betrug 50 J/cm². Die HpD-Inkubationszeit reichte von 25 h - 120 h und betrug im Mittel 45 h.

4.3.4

Kontrollversuche zur LASER-Bestrahlung von Kaninchen-
harnblasen

Bei 6 Tieren wurden tumortragende Blasen ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD zeilenförmig bestrahlt.

Die Bestrahlungsdosis betrug im Durchschnitt
50 J/cm².

4.4

Tumormodell - chemisch induzierter Tumor der Hunde-
harnblase

Mit diesem Tumormodell steht ein echter urothelialer Tumor zur Verfügung, der infolge der Größe der Versuchstiere auch einer endoskopischen Behandlung zugänglich ist.

Während einer etwa 13 Monate dauernden Tumorinduktionszeit bilden sich unter Einwirkung von FANFT*, einem Nitrofurantoin-Derivat, OADP** und zusätzlich in die Blase implantierten Methylmetacrylat-Pellets urotheliale Blasenkarzinome aus (24).

Der in diesen Versuchen verwendete Hund war der eigenen Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. Harzmann zur Verfügung gestellt worden (siehe auch Punkt 3.2.3).

* Fanft: Formylamin-Nitrofurylthiazol

** OADP: Ortho-Amino-Diphenyl

4.4.1

Integrale LASER-Bestrahlung der Hundeblyase

Die integrale Bestrahlung von Hundeblyasen wurde in der gleichen Weise wie die integrale LASER-Bestrahlung der Kaninchenblyasen durchgeföhrt. Auf die gleiche Art wurde auch die Bestimmung der Bestrahlungsdosis durchgeföhrt (siehe Punkt 4.3.3).

4.4.1.1

Integrale Bestrahlung des chemisch induzierten Blyasenkarkinoms beim Hund

In diesem Versuch wurde eine Beagle-Hündin, welche uns nach erfolgter chemischer Tumorinduktion zur Verfügung gestellt wurde (siehe Punkt 3.2.3) mehrmals endoskopisch bestrahlt. Abbildung 13 zeigt den Hund während der endoskopischen LASER-Bestrahlung. Deutlich ist sogar durch die Bauchdecke die von homogen gestreutem roten LASER-Licht ausgeleuchtete Blyase des Hundes erkennbar.



Abb. 13:
integrale LASER-Bestrahlung einer Hundeblyase

Vor Bestrahlung wies die Blase multiple papilläre und exophytische Tumoren der Schleimhaut auf.



Abb. 14 a:
endoskopische Aufnahme eines soliden Tumors der Hundeharnblase



Abb. 14 b:
endoskopische Aufnahmen multipler Tumoren der Hundeharnblase

Alle Bestrahlungen wurden endoskopisch durchgeführt. Das Streumedium wurde einheitlich in einer Verdünnung von 1 : 5 verwendet.

Die erste Bestrahlung wurde ohne vorhergehende Photosensibilisierung mit HpD durchgeführt. Hierbei wurde die rechte Blasen hinter- und Seitenwand direkt, ohne Streuung mittels Streumedium bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug etwa 30 J/cm^2 .

Die zweite Bestrahlung wurde nach der Photosensibilisierung mit HpD durchgeführt. HpD wurde vor der Bestrahlung zweimal, in Abständen von 70 h und 24 h in der üblichen Dosierung von 5 mg/kg KG intravenös verabreicht. Zuerst wurde die linke Blasenseitenwand direkt mit einer Dosis von 30 J/cm^2 bestrahlt. Anschließend wurde die Blase mit Streumedium gefüllt und mit einer Bestrahlungsdosis von 23 J/cm^2 integral bestrahlt.

Eine dritte Bestrahlung der Blasentumoren wurde nach HpD-Inkubationszeiten von 262 h, 216 h und 50 h durchgeführt. Bei den HpD-Gaben nach 262 h und 216 h handelte es sich um die gleichen, die für die zweite Bestrahlung verabreicht worden waren. Bei dieser Behandlung der Blasentumoren wurde zuerst ein solitärer Tumor ohne die Verwendung von Streumedium mit einer Bestrahlungsdosis von ca 670 J/cm^2 direkt bestrahlt. Anschließend wurde die Blase mit Streumedium gefüllt und die integrale Bestrahlung der Tumoren durchgeführt. Die Bestrahlungsdosis bei der integralen Bestrahlung betrug etwa 25 J/cm^2 .

Innerhalb dieser Versuche wurden vor und nach jedem Behandlungsschritt Probenbiopsien entnommen und zur histologischen Begutachtung gegeben. Die genaue zeitliche Abfolge der Biopsieentnahmen ist aus Punkt 5.3.1 ersichtlich.

Etwa 6 Wochen nach der letzten Bestrahlung wurde die Blase entnommen und zur histologischen Untersuchung gegeben.

4.4.1.2 Integrale LASER-Bestrahlung tumorfreier Harnblasen beim Hund

2 Beaglehunde von 13 bzw. 14 Kg Körpergewicht wurden ohne vorherige Tumorinduktion 60 h und 90 h nach HpD-Gabe integral bestrahlt. Die Bestrahlungsdosen betrugen in beiden Fällen $70 - 80 \text{ J/cm}^2$. Die Streumediumverdünnung war konstant 1:40.

Die integrale Bestrahlung wurde in üblicher Weise durchgeführt. Die Hunde wurden 8 Tagen nach der Bestrahlung eingeschláfert und seziert. Die Harnblase sowie die der Blase anliegende Vagina des ersten Hundes und ein der Blase anliegendes Darmsegment des zweiten Hundes wurden zur histologischen Begutachtung gegeben.

4.5. Versuche zur Bestimmung der Oberflächentemperatur und zur Beobachtung von Schleimhautveränderungen unmittelbar nach LASER-Bestrahlung bei der Photoradiotherapie

4.5.1. Schleimhautveränderungen unmittelbar nach LASER-Bestrahlung HpD-photosensibilisierter Rattenblasentumoren

Tumortragende Rattenblasen mit HpD-Inkubationszeiten von 36 h - 179 h, im Mittel 86 h wurden mit Dosen von $24 - 1040 \text{ J/cm}^2$, im Durchschnitt 335 J/cm^2 zeilenförmig bestrahlt.

Um thermische Schäden der Schleimhaut nach Bestrahlung ausschließen zu können, wurden die Tiere unmittelbar

nach Bestrahlung getötet, die Blasen entnommen und zur histologischen Untersuchung gegeben.

4.5.2

Temperaturkontrolle mit einer AGA-Thermokamera während der LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen

Um den Temperaturverlauf während der Bestrahlung genauer analysieren zu können, wurde die Erwärmung des Gewebes während der Bestrahlung mit einer Thermokamera verfolgt.

3 Rattenblasen wurden unter der Kontrolle mit einer AGA-Thermokamera homogen bestrahlt. Die Abbildung 15 zeigt den Versuchsaufbau der Thermokamera während der Bestrahlung.

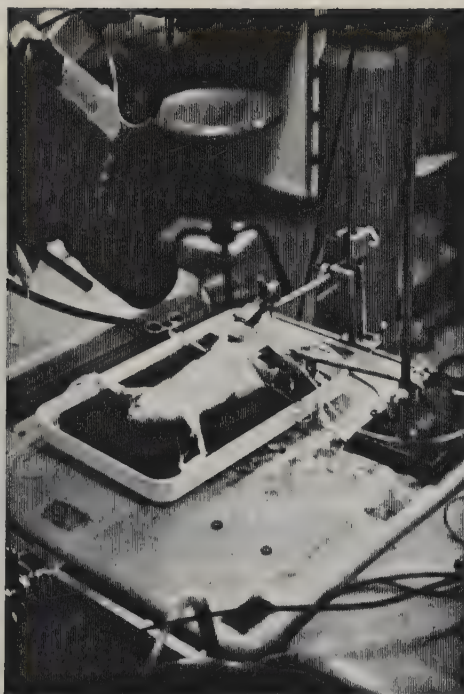


Abb. 15:
Aufbau der Thermokamera während der Bestrahlung mit
homogenem LASER-Licht: Im Bild sind die narkotisierte
Ratte, die vom Stativ gehaltene Mattscheibe sowie die
zur Temperaturkontrolle verwendete Thermokamera erkenn-
bar.

Zwei dieser 3 Ratten trugen Blasentumoren, 1 Tier hatte eine tumorfreie, unveränderte Blase. Keines der Tiere war mit HpD photosensibilisiert worden. Die ersten beiden Tiere wurden mit einer Dosis von 270 J/cm^2 bestrahlt. Die Blase des tumorfreien Tieres wurde mit einer Bestrahlungsdosis von 1000 J/cm^2 bestrahlt, wobei die Kühlung mit der physiologischen Kochsalzlösung während der 20 min dauernden Bestrahlung für 7 min unterbrochen wurde.

Die Temperaturveränderungen während der Bestrahlung wurden auf dem Farbmonitor der Thermokamera verfolgt und entsprechend protokolliert. Der Monitor war vor Bestrahlung an entsprechenden Vergleichsobjekten genau definierter Temperatur geeicht worden, so daß jede Farbe einem bestimmten Temperaturbereich entsprach.

Die Abbildung 16 zeigt den Bildschirm der Thermokamera. Deutlich sind die Konturen der Schablone und des Bestrahlungsfelds auf dem Bildschirm erkennbar. Die blaugrüne Farbe im Bestrahlungsfeld entspricht einem Temperaturbereich von 20°C - 23°C . Die Blasen wurden unmittelbar nach Bestrahlung entnommen und zur histologischen Begutachtung gegeben.



Abb. 16:

Thermobild der AGA-Thermokamera während der Bestrahlung einer Rattenblase: Der Bildschirm zeigt die Kontur der von der Schablone abgedeckten Harnblase. Das Bestrahlungsfeld ist als kreisrunder hellblauer Fleck erkennbar. Isotherme Bereiche sind durch identische Farben gekennzeichnet. Der hellblaue Fleck im Bestrahlungsfeld entspricht einem Temperaturbereich von 20°C - 23°C .

5. ERGEBNISSE

5.1 Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Rattenharnblasen

5.1.1 Effekte zeilenförmiger LASER-Bestrahlungen von Rattenharnblasen

5.1.1.1 Bestrahlungseffekte nach intraperitonealer Verabreichung von HpD

18 Ratten wurden nach einer 12 monatigen Tumorinduktionszeit mit BBN, mit HpD photosensibilisiert und bestrahlt. Die Versuche wurden wie unter Punkt 4.2.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Die histologische Untersuchung zeigte einheitlich bei allen Ratten eine von Übergangs- und Plattenepithelkarzinomanteilen ausgedehnt durchsetzte Blasenschleimhaut. Lediglich 2 Tiere wiesen winzige Reste unauffälligen Urothels auf. Bei 8 von 18 Tieren zeigten sich nach der Bestrahlung allenfalls winzige Nekrosen. Die anderen Tiere wiesen eine völlig unbeschädigte, ausgedehnt karzinomatös veränderte Blasenschleimhaut auf. Ein therapeutischer Bestrahlungseffekt war somit nicht ersichtlich. Tabelle 4 zeigt eine Zusammenstellung der histolo-

gischen Befunde nach der intraperitonealen Verabreichung des HpD und der zeilenförmigen Bestrahlung mit LASER-Licht.

Tab. 4 Übersicht über histologische Befunde nach der zeilenförmigen LASER-Bestrahlung tumortragender Rattenblasen (HpD intraperitoneal),
n = 18

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
kleinste:	8	gut erhalten:	18
keine:	10	Reste:	0
		kein Tumor:	0
 <u>normales Urothel:</u>			
restweise:	2		
keines:	16		

5.1.1.2 Bestrahlungseffekte nach intravenöser Verabreichung von HpD

15 Ratten wurden nach einer 9 bis 12 monatigen Tumor-induktionszeit mit BBN mit intravenös verabreichtem HpD photosensibilisiert und bestrahlt. Die Versuche wurden wie unter Punkt 4.2.2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die histologische Untersuchung ergab vorwiegend ausgedehnte Tumornekrosen neben Resten von erhaltenem Tumorgewebe. Auch in dieser Versuchsgruppe war nur vereinzelt normales Blasenurothel zu finden.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die histologischen Befunde nach intravenöser Verabreichung von HpD und zeilenförmiger Bestrahlung mit LASER-Licht.

Tab.5 Übersicht über histologische Befunde nach zeilenförmiger Bestrahlung tumortragender Rattenblasen (HpD intravenös),

n = 15

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	9	gut erhalten	1
herdförmig	4	Reste	11
oberflächlich	2	kein Tumor	3
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
vereinzelt	2	restweise	7
keines	13	keine	8

5.1.1.2.1

Unterschiede der Bestrahlungseffekte nach intra-venöser und intraperitonealer Verabreichung von HpD und niedriger Bestrahlungsdosis

Da die durchschnittliche Bestrahlungsdosis in der Gruppe 5.1.1.2. vergleichsweise höher lag als in der Versuchsgruppe mit intraperitonealer Injektion von HpD, werden die Ergebnisse von 5 der in der

letzten Gruppe behandelten 15 Ratten noch einmal gesondert zusammen mit den Ergebnissen der Bestrahlung von 5 Ratten aus der Gruppe 5.1.1.1. dargestellt.

Der Vergleich der Tabellen 6 a und 6 b zeigt histologische Veränderungen, deren Ausmaß nach intravenöser Verabreichung von HpD deutlich stärker war als nach intraperitonealer Verabreichung von HpD.

Tab. 6 a Übersicht über die histologischen Befunde nach intraperitonealer HpD Gabe und geringerer Bestrahlungsdosis ($D = 300 \text{ J/cm}^2$), HpD 48 h, (Selektion aus Gruppe 5.1.1.1),
 $n = 5$

Nekrosen:

ausgedehnt	0
herdförmig	0
kleinste	3
keine	2

Tumor:

gut erhalten	5
Reste	0
kein Tumor	0

normales Urothel:

restweise	0
keines	5

Tab. 6 b Übersicht über die histologischen Befunde nach intravenöser HpD-Gabe und geringerer Bestrahlungsdosis ($D = 250 \text{ J/cm}^2$), HpD 105 h (Selektion aus Gruppe 5.1.1.2),
n = 5

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	3	gut erhalten	0
herdförmig	0	Reste	3
oberflächlich	2	kein Tumor	2
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	0	restweise	3
keines	5	keine	2

5.1.1.2.2

Bestrahlungseffekte nach intravenöser Verabreichung von HpD im Hinblick auf unterschiedliche HpD-Inkubationszeiten

Bei den 15, unter Punkt 5.1.1.2 beschriebenen Versuchstieren, wurde weiterhin untersucht, inwieweit eventuelle Therapieeffekte in Abhängigkeit von einer unterschiedlichen HpD-Inkubationszeit erkennbar sind. Hierzu waren die Bestrahlungen in zwei Gruppen mit verschieden langer HpD-Inkubationszeit durchgeführt worden. 11 Tiere wurden nach einer Inkubationszeit von 19 h - 78 h bestrahlt, durchschnittlich 58 h; 4 Tiere wurden nach einer Inkubationszeit von 118 h - 169 h, durchschnittlich 133 h, bestrahlt. Die Ergebnisse der Auswertung der histologischen Befunde zeigen die Tabellen 7 und 8.

Tab.7 Übersicht über die histologischen Befunde nach unterschiedlicher HpD-Inkubationszeit. Mittlere HpD-Inkubationszeit 58 h, mittlere Bestrahlungsdosis 480 J/cm^2 (Selektion aus Gruppe 5.1.1.2),

n = 11

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	8	gut erhalten	0
herdförmig	2	Reste	8
oberflächlich	1	kein Tumor	3
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelatyphen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	1	restweise	5
keines	10	keine	6

Tab. 8 Übersicht über die histologischen Befunde nach unterschiedlicher HpD-Inkubationszeit.

Mittlere HpD-Inkubationszeit 133 h, mittlere Bestrahlungsdosis 660 J/cm^2 (Selektion aus Gruppe 5.1.1.2),

n = 4

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	1	gut erhalten	1
herdförmig	2	Reste	3
oberflächlich	1	kein Tumor	0
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelatyphen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	1	restweise	2
keines	3	keine	2

Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen im Hinblick auf das Ausmaß der Nekrosen und die noch vorhandenen Tumoren eine größere Tumorreduktion als die Ergebnisse in Tabelle 8, obgleich die Versuche, die in Tabelle 8 zusammengestellt sind, mit einer höheren durchschnittlichen Bestrahlungsdosis durchgeführt wurden als die, die in Tabelle 7 zusammengefaßt sind.

5.1.1.3 Kontrollversuche: zeilenförmige LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen ohne Photosensibilisierung

5.1.1.3.1 Effekte nach LASER-Bestrahlung nicht mit HpD-photosensibilisierter Rattenblasentumoren

5 Ratten wurden nach 12 - 14 monatiger Tumorinduktion mit BBN, ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD, zeilenförmig überstreichend bestrahlt (siehe Punkt 4.2.2.2.3.1). Die Bestrahlung erfolgte mit Dosen von 430 J/cm^2 . Aus Tabelle 9 sind die Effekte der Bestrahlungen anhand der Übersicht über die histologischen Befunde ersichtlich. Die Tumoren waren insgesamt nahezu vollständig erhalten und wiesen nur in 2 Fällen leichte oberflächliche Nekrosen auf.

Wie auch in den vorherigen Versuchsgruppen ist wieder erkennbar, daß durch die chemische Induktion von Blasentumoren das gesamte Urothel maligne verändert wird.

Tab. 9 Übersicht über die histologischen Befunde nach zeilenförmiger Bestrahlung nicht photosensibilisierter Blasentumoren, Bestrahlungsdosis im Mittel 430 J/cm^2 , $n = 5$

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
oberflächlich	2	gut erhalten	5
keine	3		
<u>normales Urothel:</u>			
keines	5		

5.1.1.3.2

Effekte nach LASER-Bestrahlung nicht photosensibilisierter tumorfreier Rattenblasen mit verschiedenen Bestrahlungsdosen

Tumorfreie Rattenblasen wurden ohne vorhergehende Photosensibilisierung mit HpD in 5 Gruppen mit ansteigenden Bestrahlungsdosen bestrahlt (siehe Punkt 4.2.2.2.3.2). Bei keiner der Gruppen waren ausgedehnte Nekrosen an den Rattenharnblasen erkennbar. Erst in Gruppe 5 (der Gruppe mit der höchsten Bestrahlungsdosis) zeigte sich eine Zunahme oberflächlicher Nekrosen und damit eine Verminderung ausgedehnt erhaltenen Epithels. In den Gruppen 2, 3, 4 und 5 waren außerdem in zunehmendem Maß geringe Entzündungen in der Blasenwand erkennbar. Tabelle 10 zeigt die Unterschiede der histologischen Befunde in Abhängigkeit von den ansteigenden Bestrahlungsdosen

Tab. 10 Übersicht über die Effekte nach zeilenförmiger Bestrahlung tumorfreier Rattenblasen ohne HpD, mit steigenden Bestrahlungsdosen (D) behandelt : Die Bestrahlungsdosen in den einzelnen Gruppen betrugen wie folgt:

Gruppe 1	60 - 180 J/cm ²
Gruppe 2	240 - 282 J/cm ²
Gruppe 3	400 - 480 J/cm ²
Gruppe 4	533 - 738 J/cm ²
Gruppe 5	1000 - 1200 J/cm ²

Gruppe 1)	<u>Nekrosen:</u>	<u>erhaltenes Epithel:</u>	<u>Entzündung:</u>
n = 4	ausgedehnt 0 oberflächl. 2 herdförmig 1 keine 1	ausgedehnt 4 restweise 0 kein 0	keine 4
Gruppe 2)	<u>Nekrosen:</u>	<u>erhaltenes Epithel:</u>	<u>Entzündung:</u>
n = 3	ausgedehnt 0 oberflächl. 0 herdförmig 1 keine 2	ausgedehnt 3 restweise 0 keines 0	keine 2 gering 1
Gruppe 3)	<u>Nekrosen:</u>	<u>erhaltenes Epithel:</u>	<u>Entzündung:</u>
n = 3	ausgedehnt 0 oberflächl. 0 herdförmig 1 keine 2	ausgedehnt 3 restweise 0 keines 0	keine 2 gering 0 mittel 1 stark 0

Fortsetzung von Tabelle 10 :

Gruppe 4)	<u>Nekrosen:</u>	<u>erhaltenes Epithel:</u>	<u>Entzündung:</u>
n = 4	ausgedehnt 0	ausgedehnt 4	keine 1
	oberflächl. 1	restweise 0	gering 3
	herdförmig 1	kein 0	mittel 0
	keine 2		stark 0

Gruppe 5)	<u>Nekrosen:</u>	<u>erhaltenes Epithel:</u>	<u>Entzündung:</u>
n = 3	ausgedehnt 0	ausgedehnt 2	keine 0
	oberflächl. 3	restweise 1	gering 3
	herdförmig 0	keines 0	mittel 0
	keine 0		stark 0

5.1.2 Effekte der homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen

5.1.2.1 Homogene LASER-Bestrahlung von Rattenblasen mit nicht infiltrierend wachsenden Tumoren

5.1.2.1.1 Behandlung nach 17 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis im Mittel 139 J/cm²

8 Ratten wurden nach einer 6 monatigen Tumorinduktionszeit mit BBN mit HpD photosensibilisiert und bestrahlt. Die Versuche wurden wie unter Punkt 4.2.3.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Tabelle 11 gibt eine Übersicht der Ergebnisse der histologischen Befunde. Wegen der Einheitlichkeit des Bildes wurden die histologischen Befunde außerhalb des Bestrahlungsfelds gemeinsam dargestellt.

Tab. 11 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung tumortragender Rattenblasen HpD-Inkubationszeit 17 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 139 J/cm^2 ,
n = 8

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	7	gut erhalten	0
oberflächl.	0	Reste	0
herdförmig	1	keiner	8
keine	0		
<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	4	restweise	1
keines	4	keine	7

Im Bestrahlungsfeld konnte bei keinem der Tiere nach Bestrahlung noch intaktes Tumorgewebe gefunden werden. Bei der Hälfte der Tiere war neben ausgedehnten Nekrosen vereinzelt noch normales, in einem Fall atypisch verändertes Urothel vorhanden. Ansonsten zeichneten sich die bestrahlten Bereiche durch vollständige Urotheldefekte aus.

Die unter der Schleimhaut liegenden Gewebeschichten der Blase zeigten sich unbeschädigt.

Außerhalb des Bestrahlungsfeldes fand sich in allen Fällen ein unverändertes Urothelkarzinom verschiedener Differenzierungsgrade ohne nennenswerte therapiebedingte Veränderungen.

5.1.2.1.1.1 Vergleich der Therapieeffekte nach 120 J/cm²
und 150 J/cm², HpD-Inkubationszeit 17 h

Die 8 Tiere der Gruppe 5.1.2.1.1 waren unabhängig von der Bestrahlungsdosis zusammengefasst betrachtet worden. Bei der erfolgten Bestrahlung mit einer Dosis von 120 J/cm² bzw. 150 J/cm² erschien es von Interesse, ob eine Dosisdifferenz von 30 J/cm² Unterschiede im histologischen Bild bewirkt. Die 8 Ratten wurden deshalb in 2 Gruppen geteilt.

Je 4 Rattenblasen der Versuchsgruppe 5.1.2.1.1 wurden nach 17 stündiger HpD-Inkubationszeit mit 120 J/cm² und 150 J/cm² bestrahlt. Die Zusammenfassung der histologischen Befunde ist aus den Tabellen 12 und 13 zu ersehen. Der Vergleich der beiden Tabellen zeigt, daß bei einer Dosisdifferenz von 30 J/cm² keinen Unterschied hinsichtlich der Bestrahlungsergebnisse besteht.

Tab. 12 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung tumortragender Rattenblasen, Bestrahlungsdosis 120 J/cm^2 , HpD-Inkubationszeit 17 h, (Selektion aus Gruppe 5.1.2.1.1),

n = 4

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	4	gut erhalten	0
herdförmig	0	Reste	0
oberflächl.	0	kein	4
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	2	restweise	0
keines	2	keine	4

Tab. 13 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung tumortragender Rattenblasen, Bestrahlungsdosis 150 J/cm^2 , HpD-Inkubationszeit 17 h, (Selektion aus Gruppe 5.1.2.1.1),

n = 4

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	3	gut erhalten	0
herdförmig	0	Reste	0
oberflächl.	1	kein	4
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	1
restweise	2	restweise	1
keines	2	keine	3

5.1.2.1.2 Behandlung nach 55 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm²

In dieser Versuchsserie wurde die HpD-Inkubationszeit auf 55 h verlängert. 5 Tiere, deren Blasen tumoren die gleichen Stadien wie die der vorhergehenden Gruppe aufwiesen, wurden mit einer Bestrahlungsdosis von einheitlich 150 J/cm² homogen bestrahlt.

Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die histologischen Veränderungen im Bestrahlungsfeld nach homogener LASER-Bestrahlung und 55 stündiger HpD-Inkubationszeit

Tab.14 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung tumortragender Rattenblasen
HpD-Inkubationszeit 55 h,
n = 5

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	1	gut erhalten	1
herdförmig	1	Reste	0
oberflächl.	2	kein	4
keine	1		
<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	5	restweise	1
keines	0	keine	4

Bei Bestrahlung nach 55 h HpD-Inkubationszeit verringerte sich das Ausmaß der Nekrosen deutlich, während der Anteil gut erhaltenen Urothels etwas anwuchs. Allerdings wurde auch in einem Fall ein gut erhaltener Tumor gefunden.

Außerhalb des Bestrahlungsfeldes fand sich einheitlich unverändertes Urothelkarzinom, welches an keiner Stelle Anzeichen einer Schädigung zeigte. Auch hier waren die unter der Schleimhaut liegenden Gewebeschichten vollkommen unversehrt.

5.1.2.2 Effekte einer homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen mit infiltrativem Tumorwachstum

5.1.2.2.1 Behandlung nach 17 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm²

In dieser Versuchserie wurden 3 Rattenblasen nach einer HpD-Inkubationszeit von 17 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug einheitlich 30 J/cm². Bei allen Tieren lagen Blasentumoren infiltrativen Wachstums vor.

Tabelle 15 gibt eine Übersicht über die histologischen Befunde. Die Situation außerhalb des Bestrahlungsfeldes wird wieder zusammenfassend geschildert.

Tab. 15 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung infiltrierender Rattenblasentumoren, HpD-Inkubationszeit 17 h, Bestrahlungsdosis 30 J/cm^2 ,

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	0	gut erhalten	3
herdförmig	1	Reste	0
oberflächl.	2	kein	0
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	0	restweise	1
keines	3	keine	2

Außerhalb des Bestrahlungsfeldes fand sich stets ein ausgeprägtes Urothelkarzinom, teils oberflächlich, teils bis in die Muskulatur infiltrierend, mit einzelnen flachen Defekten.

Im Bestrahlungsfeld hat sich das Ausmaß der Nekrosen und die Tumorreduktion gegenüber den vorab beschriebenen Versuchen stark verringert. Bei einem Tier war im Bestrahlungsfeld in einer knotigen Tumordinfiltration eine größere Nekrose erkennbar, welche aber bei der Größe des Tumors auch eine Spontannekrose sein könnte und deshalb nicht in Tabelle 15 aufgenommen wurde.

5.1.2.2.2 Behandlung nach 17 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm²

In dieser Versuchsgruppe wurden 7 Rattenblasen nach einer HpD-Inkubationszeit von 17 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis wurde im Gegensatz zu den beiden vorherigen Gruppen auf 150 J/cm² gesteigert.

Das Ausmaß des Tumorwachstums außerhalb der bestrahlten Bezirke erstreckte sich vom Blasenkarzinom beginnender Infiltration in die Submukosa, bis hin zur Infiltration durch alle Wandschichten.

Tabelle 16 zeigt eine Übersicht über die Veränderungen des Gewebes innerhalb des Bestrahlungsfeldes.

Tab. 16 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung infiltrierender Rattenblasentumoren, HpD-Inkubation 17 h, Bestrahlungsdosis 150 J/cm²,

n = 7

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	0	gut erhalten	7
herdförmig	0	Reste	0
oberflächl.	7	kein	0
keine	0		
<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
restweise	0	restweise	0
keines	7	keine	7

Im Vergleich zu den nicht bestrahlten Arealen ergaben sich hinsichtlich der histologischen Beurteilung nur geringe Unterschiede, so daß nur kleine, teilweise fragliche Therapieeffekte erkennbar waren.

5.1.2.2.3 Behandlung nach 55 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 30 J/cm²

In dieser Serie wurde die HpD-Inkubationszeit von 17 h auf 55 h gesteigert. 3 Rattenblasen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 55 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug wieder 30 J/cm². Die Auswertung der histologischen Befunde wird in Tabelle 17 wiedergegeben. Die Zusammenfassung der histologischen Befunde nicht bestrahlter Bezirke ergab, daß in allen Fällen ein ausgeprägtes Urothelkarzinom, teils plattenepithelialer Differenzierung vorlag. Stellenweise waren Verhornungen vorhanden. Neben einer beginnenden Infiltration war auch eine ausgeprägter Infiltration der Blasenwand erkennbar.

Tab. 17 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender Rattenblasentumoren, HpD-Inkubationszeit 55 h, Bestrahlungsdosis 30 J/cm²,

n = 4

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	0	gut erhalten	4
herdförmig	0	Reste	0
oberflächl.	4	kein	0
keine	0		
<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
vereinzelt	0	restweise	0
keines	4	keine	4

Auch in dieser Gruppe ist im Gegensatz zu der Gruppe mit einem nicht infiltrierenden Tumorstadium kein ausreichender Therapieeffekt erkennbar.

5.1.2.2.4 Behandlung nach 55 h HpD-Inkubationszeit, Bestrahlungsdosis 150 J/cm²

4 Rattenblasen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 55 h mit LASER-Licht homogen bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug jeweils 150 J/cm².

Die Situation außerhalb der bestrahlten Bezirke war einheitlich und unterschied sich nicht von den Befunden der Gruppen 5.1.2.2.1, 2, und 3.

Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die histologischen Befunde in den bestrahlten Arealen.

Tab. 18 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung infiltrierender Rattenblasentumoren, HpD 55 h, Bestrahlungsdosis 150 J/cm²,
n = 4

Nekrosen:

ausgedehnt	0
herdförmig	0
oberflächl.	4
keine	0

Tumor:

gut erhalten	4
Reste	0
kein	0

normales Urothel:

ausgedehnt	0
vereinzelt	0
keines	4

Epithelotypen:

ausgedehnt	0
restweise	0
keine	4

Auch in dieser Gruppe zeigte das histologische Bild innerhalb der Bestrahlungsfelder keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu den 3 vorhergehenden Gruppen. Allerdings waren bei zwei Blasen stellenweise in

der Tiefe Nekrosen in den bestrahlten Bezirken vorhanden. Diese Nekrosen reichten in einem Fall bis in den Bereich der Muskulatur. Ein über die Schablone, mit der die Blasen abgedeckt waren, hinausreichender exophytischer Tumor, der ebenfalls bestrahlt wurde, wies ausgedehnte Nekrosen auf.

5.1.2.3 Kontrollversuche zur homogenen Bestrahlung von Rattenblasen

5.1.2.3.1 Bestrahlung tumortragender Rattenblasen ohne Photosensibilisierung mit HpD, Bestrahlungsdosis 260 J/cm^2

Als Kontrollversuche wurden bei 8 Ratten tumortragende Blasen ohne vorherige HpD-Photosensibilisierung mit HpD bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis bewegte sich zwischen Werten von 225 J/cm^2 - 270 J/cm^2 (durchschnittlich 260 J/cm^2). Tabelle 19 zeigt eine Übersicht über die histologischen Befunde.

Tab. 19 Übersicht über die histologischen Befunde nach homogener LASER-Bestrahlung nicht photosensibilisierter oberflächlicher Rattenblasentumoren.

Mittlere Bestrahlungsdosis 260 J/cm^2 ,

n = 8

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	0	gut erhalten	8
herdförmig	0	Reste	0
oberflächl.	0	kein	0
keine	8		
<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
vereinzelt	0	restweise	0
keines	8	keine	8

Abgesehen von 3 winzigen, herdförmigen und oberflächlichen Defekten war im Bestrahlungsfeld ein unveränderter urothelialer Tumor unterschiedlicher Größe vorhanden. Außerhalb des Bestrahlungsfelds bot sich ebenfalls das Bild eines unveränderten Tumors mit lediglich einem, vergleichsweise geringem, erosiven Defekt in einem Fall. Insgesamt war in keinem der bestrahlten, jedoch zuvor nicht photosensibilisierten Fälle eine Tumorregression erkennbar.

5.1.2.3.2 Bestrahlung tumorfreier Rattenblasen, HpD-Inkubationszeiten von 30 min - 48 h, Bestrahlungsdosis 120 J/cm^2

In dieser Versuchsreihe wurden in 5 Gruppen je 3 tumorfreie Rattenblasen nach ansteigenden HpD-Inkubationszeiten mit einer konstanten Bestrahlungsdosis von 120 J/cm^2 homogen bestrahlt.

Tab. 20 zeigt eine Übersicht über die histologischen Veränderungen des Urothels nach Bestrahlung. Außerhalb des Bestrahlungsfeldes war das histologische Bild gleichmäßig von unverändertem Urothel gekennzeichnet.

Tab. 20 Histologische Veränderungen nach homogener LASER-Bestrahlung tumorfreier Rattenblasen, mit verschiedenenlangen HpD-Inkubationszeiten. Bestrahlungsdosis 120 J/cm^2 ,

Gruppe 1) HpD 30 min

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	3	ausgedehnt	0
oberflächl.	0	vereinzelt	1
herdförmig	0	keines	2
keine	0		

Gruppe 2) HpD 6 h

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	2	ausgedehnt	0
oberflächl.	1	vereinzelt	2
herdförmig	0	keines	1
keine	0		

Gruppe 3) HpD 12 h

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	3
oberflächl.	3	vereinzelt	0
herdförmig	0	keines	0
keine	0		

Fortsetzung von Tabelle 20

Gruppe 4) HpD 24 h

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	2
oberflächl.	2	vereinzelt	1
herdförmig	1	keines	0
keine	0		

Gruppe 5) HpD 48 h

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	3
oberflächl.	0	vereinzelt	0
herdförmig	3	keines	0
keine	0		

Die histologischen Befunde lassen deutlich erkennen, daß das Ausmaß der Epithelschädigung mit wachsender HPD-Inkubationszeit abnimmt.

Außerhalb des Bestrahlungsbereichs lag unverändertes, nicht geschädigtes Urothel vor.

5.1.2.3.3 Bestrahlung tumorfreier, nicht photosensibilisierter
Rattenblasen, Bestrahlungsdosen von 50 J/cm² -700
J/cm²

In dieser Versuchsserie wurden in 4 Gruppen die Bestrahlungsdosen ansteigend gewählt. Die Bestrahlungsdosen waren jedoch innerhalb der einzelnen Gruppen konstant. Je 3 tumorfreie Blasen wurden homogen mit LASER-Licht bestrahlt.

Tabelle 21 zeigt eine Übersicht der histologischen Veränderungen innerhalb des Bestrahlungsfeldes nach homogener LASER-Bestrahlung. Außerhalb des Bestrahlungsfeldes war das Urothel, wie auch schon bei der vorhergehenden Gruppe, vollständig unbeschädigt geblieben.

Tab. 21 Histologische Veränderungen nach homogener LASER-Bestrahlung tumorfreier, nicht photosensibilisierter Rattenblasen mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen

Gruppe 1) Bestrahlungsdosis 50 J/cm²,
n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	3
oberflächl.	0	vereinzelt	0
herdförmig	1	keines	0
keine	2		

Fortsetzung von Tabelle 21

Gruppe 2) Bestrahlungsdosis 150 J/cm^2 ,

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	2
oberflächl.	2	vereinzelt	1
herdförmig	0	keines	0
keine	1		

Gruppe 3) Bestrahlungsdosis 350 J/cm^2 ,

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	(1)	ausgedehnt	0
oberflächl.	2	vereinzelt	3
herdförmig	0	keines	0
keine	0		

Gruppe 4) Bestrahlungsdosis 700 J/cm^2 ,

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	3
oberflächl.	1	vereinzelt	0
herdförmig	1	keines	0
keine	1		

Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen zeigt eine geringfügige Zunahme der Epithelschädigung in Gruppe 3, wobei der in Klammern gesetzte Fall einer ausgeprägten Nekrose nur bedingt zu verwerten war, da hier unter der Bestrahlung die LASER-Leistung unkontrollierbar angestiegen war, und die Schädigung auf eine zu hohe Bestrahlungsdosis zurückgeführt werden muß.

5. 2 Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Kaninchenharnblasen

5.2.1 Effekte zeilenförmiger LASER-Bestrahlung transplan- tierter Brown - Pearce Tumoren der Kaninchenharnblase

5.2.1.1 Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen, HpD- Inkubationszeit im Mittel 45 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 81 J/cm²

9 Kaninchen wurden nach einer HpD-Inkubationszeit von 41 h - 48 h, im Mittel 45 h, mit Bestrahlungsdosen von 29 J/cm² - 160 J/cm² zeilenförmig mit LASER-Licht bestrahlt.

Bei 7 Kaninchen waren zum Zeitpunkt der Bestrahlung makroskopisch Tumoren sichtbar. In zwei Fällen konnten dem makroskopischen Aspekt nach keine eindeutigen Tumoren identifiziert werden. In diesen Fällen ergab die histologische Untersuchung nach Behandlung einmal eine 2 - 3 mm große Tumordinfiltration ohne Nekrose, im zweiten Fall eine herdförmige, knotige Tumordinfiltration, mit bis in die Submucosa reichenden Ulzerationen. Eine Übersicht über die gesamten histologischen Ergebnisse zeigt Tabelle 22.

Das Ausmaß des nach Bestrahlung verbliebenen Tumors ließ infolge primär unterschiedlichen Wachstums und unterschiedlicher Angehrate der Tumoren keine Schlüsse auf einen Therapieerfolg zu. Insofern wurde bei den Versuchen mit Brown-Pearce Tumoren auf eine Differenzierung der Tumorgroße verzichtet. Nur das Vorhandensein oder die vollständige Zerstörung des Tumors wurden registriert.

Tab. 22 Übersicht über die histologischen Befunde nach zeilenförmiger LASER-Bestrahlung transplanterter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase nach vorhergehender Photosensibilisierung mit HpD.

Mittlere HpD-Inkubationszeit 45 h, mittlere Bestrahlungsdosis 81 J/cm²,

n = 9

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	7	vorhanden	4
mäßig vorh.	1	kein	5
keine	1		
 <u>normales Urothel:</u>			
ausgedehnt	3		
restweise	4		
keines	2		

In 5 von 9 Fällen konnte eine vollständige Tumordesstruktion erreicht werden. Dementsprechend war auch in 4 Fällen intaktes Urothel nur in Resten erkennbar. In zwei Fällen war im histologisch untersuchten Bereich überhaupt kein Epithel mehr vorhanden.

5.2.1.2

Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen,
HpD-Inkubationszeit im Mittel 68 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 56 J/cm²

In dieser Gruppe wurden 6 Tiere nach einer mittleren HpD-Inkubationszeit von 68 h zeilenförmig bestrahlt. Bei allen Tieren waren zum Zeitpunkt der Bestrahlung makroskopisch Tumoren erkennbar. Die Bestrahlungsdosis lag zwischen 27 J/cm² und 90 J/cm². Sie betrug durchschnittlich 56 J/cm².

In dieser Versuchsreihe, welche im Unterschied zu der vorhergehenden Gruppe eine längere HpD-Inkubationszeit aufwies, konnte nur bei der Hälfte der Tiere eine vollständige Zerstörung der Tumoren erreicht werden. In 5 von 6 Fällen traten ausgedehnte Nekrosen auf (bei vergleichsweise 7 von 9 Fällen der vorhergehenden Gruppe). Normales Urothel wurde ausgedehnt in 2, in Resten noch in 4 der 6 bestrahlten Blasen gefunden. Tabelle 23 gibt eine Übersicht über die histologischen Befunde dieser Versuchsserie.

Tab. 23 Übersicht über die histologischen Befunde nach zeilenförmiger LASER-Bestrahlung transplanterter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase, mittlere HpD-Inkubationszeit 68 h, mittlere Bestrahlungsdosis 56 J/cm²,
n = 6.

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	5	vorhanden	3
vereinzelt	1	kein	3
keine	0		
 <u>normales Urothel:</u>			
ausgedehnt	2		
vereinzelt	4		
keines	0		

5.2.1.3 Bestrahlung tumortragender Kaninchenharnblasen nach zweimaliger Gabe von HpD; letzte HpD-Inkubationszeit im Mittel 21 h, Bestrahlungsdosis im Mittel 80 J/cm²

In dieser Serie wurden 6 Tiere nach zweimaliger HpD-Gabe zeilenförmig bestrahlt. Das erste Mal nach durchschnittlich 52 h, das zweite Mal nach durchschnittlich 21 h. Die Bestrahlungsdosen betrugen im Durchschnitt 80 J/cm².

Die Beurteilung der histologischen Ergebnisse erfolgte nach den gleichen Gesichtspunkten wie unter 5.2.1.1 und 5.2.1.2 .

Tabelle 24 zeigt eine Übersicht über diese Auswertung.

Tab. 24 Übersicht über die histologischen Befunde nach zeilenförmiger LASER-Bestrahlung transplantiertter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase. Zweimalige HpD-Gabe, nach durchschnittlich 52 h und 21 h. Mittlere Bestrahlungsdosis 80 J/cm²,
n = 6

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	6	vorhanden	2
mäßig vorh.	0	kein	4
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>	
ausgedehnt	0
vereinzelt	4
keines	2

Nach zweimaliger HpD-Gabe und einer kürzeren HpD-Inkubationszeit vor der Bestrahlung erhöhte sich das Ausmaß an Nekrosen deutlich. Auch intaktes Urothel verringerte sich. Es konnte in 4 Fällen nur noch restweise und bei zwei Tieren überhaupt nicht gefunden werden. Die Tumorregression steigerte sich auf vier von sechs Tieren, bei welchen kein Tumor mehr gefunden werden konnte.

5.2.2 Effekte integraler Bestrahlung transplantiertter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase

11 Kaninchen wurden nach erfolgter Tumortransplantation endoskopisch integral wie unter Punkt 4.3.3 beschrieben bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug im Durchschnitt 51 J/cm^2 . Die HpD-Inkubationszeit betrug im Mittel 45 h. Bei 5 Fällen konnte nach Bestrahlung kein Tumor mehr gefunden werden. Ein Vergleich mit den Gruppen 5.2.1.1 und 5.2.1.2 zeigt, daß tumorfreies Urothel bei dieser Therapieform weniger geschädigt wird. Ausgedehnte Nekrosen konnten abgesehen von einem Fall bei allen Tieren gefunden werden. Sie waren jedoch örtlich begrenzt und nur in einem Fall über ausgedehntere Schleimhautbezirke verteilt. Tabelle 25 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der histologischen Befunde nach Bestrahlung.

Tab. 25 Übersicht über die histologische Befunde nach integraler Bestrahlung transplanterter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase. Mittlere Bestrahlungsdosis 51 J/cm^2 , mittlere HpD-Inkubationszeit 45 h, n = 11

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	10	vorhanden	6
mäßig vorh.	1	kein	5
keine	0		
 <u>normales Urothel:</u>			
ausgedehnt	3		
vereinzelt	8		
keines	0		

5.2.3 Kontrollversuche zur LASER-Bestrahlung von Kaninchenharnblasen

Bei 6 Kaninchen wurden tumortragende Blasen nach der unter Punkt 4.3.4 beschriebenen Methode ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD zeilenförmig bestrahlt. Die durchschnittliche Bestrahlungsdosis betrug 50 J/cm^2 .

Tabelle 26 gibt eine Übersicht über die histologischen Befunde.

Tab. 26 Übersicht über die histologischen Befunde nach zeilenförmiger LASER-Bestrahlung transplantiertter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD,
n = 6

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	1	vorhanden	4
mäßig vorh.	4	kein	2
keine	1		
 <u>normales Urothel:</u>			
ausgedehnt	4		
vereinzelt	2		
keines	0		

In dieser Serie war eine Tumorreduktion bei 2 von 6 behandelten Tieren erkennbar. In allen Fällen konnte überwiegend unverändertes Urothel gefunden werden. Auch das Ausmaß der Nekrosen war nirgends so deutlich ausgeprägt wie in den vorhergehenden Gruppen.

5.3 Integrale LASER-Bestrahlung der Hundeharnblase

5.3.1 Integrale Bestrahlung des chemisch induzierten Blasenkarzinoms beim Hund

In diesem Versuch wurde eine Hund, welcher uns nach erfolgter chemischer Tumorinduktion im Endstadium der Tumorentwicklung zur Verfügung gestellt wurde (siehe Punkt 3.2.3) mehrmals nach der unter Punkt 4.4 beschriebenen Methode endoskopisch bestrahlt. Vor Bestrahlung wies die Harnblase makroskopisch

multiple große exophytisch papilläre Tumoren der Blaseschleimhaut auf.

Probeexzisionen vor Beginn der Behandlung zeigten histologisch ein solides, teilweise infiltrierend wachsendes Urothelkarzinom (G II - G III) neben oberflächlichen Urotheldysplasien unterschiedlicher Grade. Unmittelbar nach der ersten Bestrahlung waren endoskopisch keine Veränderungen der Blaseschleimhaut erkennbar. Auch die Biopsien, die nach der Bestrahlung entnommen wurden, ließen histologisch keine Veränderungen im Sinne eines Therapieeffekts erkennen. Sie zeigten vielmehr ein unverändertes Urothelkarzinom mit teilweise infiltrierendem Wachstum.

Die Biopsien, die vor der zweiten Bestrahlung entnommen wurden, zeigten ein Urothelkarzinom mit teilweise infiltrierendem Wachstum. Biopsien, die unmittelbar nach der zweiten Bestrahlung (nach HpD i.v) entnommen wurden, zeigten das gleiche histologische Bild. Erst die Biopsien, die 8 Tage nach der zweiten Bestrahlung entnommen wurden, ließen einen Therapieeffekt erkennen. Hier konnte nur noch restweise Tumorgewebe, neben ausgedehnten Nekrosen gefunden werden.

Die vor der dritten Bestrahlung entnommenen Biopsien zeigten wiederum intaktes Tumormaterial. Nekrosen waren in den Biopsiestückchen nicht erkennbar.

Die Biopsie, die unmittelbar nach Bestrahlung durchgeführt wurden, zeigten ausgedehnte Nekrosen und es bot sich kein Anhalt für intaktes Tumorgewebe.

Ein völlig identisches Bild zeigten die Biopsien, die 6 Tage nach der Bestrahlung aus dem direkt bestrahlten Bezirk und den integral bestrahlten Bereichen der Blase entnommen worden waren.

Etwa 6 Wochen nach der letzten Bestrahlung wurde die Blase entnommen und zur histologischen Untersuchung gegeben. Die histologische Begutachtung ergab das Vor-

Tab. 26 Übersicht über die histologischen Befunde nach zeilenförmiger LASER-Bestrahlung transplantiertter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase ohne vorherige Photosensibilisierung mit HpD,
n = 6

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	1	vorhanden	4
mäßig vorh.	4	kein	2
keine	1		
 <u>normales Urothel:</u>			
ausgedehnt	4		
vereinzelt	2		
keines	0		

In dieser Serie war eine Tumorreduktion bei 2 von 6 behandelten Tieren erkennbar. In allen Fällen konnte überwiegend unverändertes Urothel gefunden werden. Auch das Ausmaß der Nekrosen war nirgends so deutlich ausgeprägt wie in den vorhergehenden Gruppen.

5.3 Integrale LASER-Bestrahlung der Hundeharnblase

5.3.1 Integrale Bestrahlung des chemisch induzierten Blasenkarzinoms beim Hund

In diesem Versuch wurde eine Hund, welcher uns nach erfolgter chemischer Tumorinduktion im Endstadium der Tumorentwicklung zur Verfügung gestellt wurde (siehe Punkt 3.2.3) mehrmals nach der unter Punkt 4.4 beschriebenen Methode endoskopisch bestrahlt. Vor Bestrahlung wies die Harnblase makroskopisch

multiple große exophytisch papilläre Tumoren der Blasenschleimhaut auf.

Probeexzisionen vor Beginn der Behandlung zeigten histologisch ein solides, teilweise infiltrierend wachsendes Urothelkarzinom (G II - G III) neben oberflächlichen Urotheldysplasien unterschiedlicher Grade. Unmittelbar nach der ersten Bestrahlung waren endoskopisch keine Veränderungen der Blasenschleimhaut erkennbar. Auch die Biopsien, die nach der Bestrahlung entnommen wurden, ließen histologisch keine Veränderungen im Sinne eines Therapieeffekts erkennen. Sie zeigten vielmehr ein unverändertes Urothelkarzinom mit teilweise infiltrierendem Wachstum.

Die Biopsien, die vor der zweiten Bestrahlung entnommen wurden, zeigten ein Urothelkarzinom mit teilweise infiltrierendem Wachstum. Biopsien, die unmittelbar nach der zweiten Bestrahlung (nach HpD i.v.) entnommen wurden, zeigten das gleiche histologische Bild. Erst die Biopsien, die 8 Tage nach der zweiten Bestrahlung entnommen wurden, ließen einen Therapieeffekt erkennen. Hier konnte nur noch restweise Tumorgewebe, neben ausgedehnten Nekrosen gefunden werden.

Die vor der dritten Bestrahlung entnommenen Biopsien zeigten wiederum intaktes Tumormaterial. Nekrosen waren in den Biopsiestückchen nicht erkennbar.

Die Biopsie, die unmittelbar nach Bestrahlung durchgeführt wurden, zeigten ausgedehnte Nekrosen und es bot sich kein Anhalt für intaktes Tumorgewebe.

Ein völlig identisches Bild zeigten die Biopsien, die 6 Tage nach der Bestrahlung aus dem direkt bestrahlten Bezirk und den integral bestrahlten Bereichen der Blase entnommen worden waren.

Etwa 6 Wochen nach der letzten Bestrahlung wurde die Blase entnommen und zur histologischen Untersuchung gegeben. Die histologische Begutachtung ergab das Vor-

liegen ausgedehnter Nekrosen der Blasenschleimhaut, teilweise 8 mm tief in die Blasenwand reichend, neben einem winzigen Rest intakten Urothels. Außerdem waren einzelne winzige Infiltrate atypischen Urothels lediglich im Bereich der Schleimhautanteile erkennbar, die von dem künstlichen Blasenstein (Methoacryl-Pelett) abgedeckt gewesen waren. Tabelle 27 zeigt eine Gegenüberstellung der einzelnen Behandlungsschritte und der zugehörigen histologischen Befunde.

Tab. 27 Gegenüberstellung der Behandlungsschritte und der entsprechenden histologischen Befunde nach Bestrahlung einer tumortragenden Hundeharnblase,

1. Bestrahlung:

kein HpD, rechte Blasenseiten- und Hinterwand direkt bestrahlt. Bestrahlungsdosis 30 J/cm^2

1. Probeexzision:

unmittelbar
vor Bestrahlung

histologischer Befund:

Dysplasien, Urothelkarzinom (G II, III)
keine Nekrosen

2. Probeexzision:

6 Tage nach
Bestrahlung

histologischer Befund:

Tumor erhalten,
keine Nekrosen

2. Bestrahlung:

HpD-Inkubationszeit 70 h und 24 h, linke Blasenseitenwand direkt bestrahlt, Bestrahlungsdosis 30 J/cm^2 , gesamte Blase integral bestrahlt, Bestrahlungsdosis 23 J/cm^2

1. Probeexzision:

unmittelbar
vor Bestrahlung

histologischer Befund:

Tumor erhalten,
keine Nekrosen

2. Probeexzision:

unmittelbar
nach Bestrahlung

histologischer Befund:

Tumor erhalten,
keine Nekrosen

3. Probeexzision:

8 Tage nach
Bestrahlung

histologischer Befund:

restweise Tumor vorhanden,
ausgedehnte Nekrosen

3. Bestrahlung:

HpD-Inkubationszeit 262 h, 216 h, 50 h, solitärer Tumor direkt bestrahlt, Bestrahlungsdosis 675 J/cm^2 , gesamte Blase integral bestrahlt, Bestrahlungsdosis 25 J/cm^2

1. Probeexzision:

unmittelbar
vor Bestrahlung

histologischer Befund:

Tumor erhalten,
keine Nekrosen

2. Probeexzision:

unmittelbar
nach Bestrahlung

histologischer Befund:

kein Tumor,
ausgedehnte Nekrosen

<u>3. Probeexzision:</u>	<u>histologischer Befund:</u>
6 Tage nach	kein Tumor,
Bestrahlung,	ausgedehnte Nekrosen
solitärer Tumor	

<u>4. Probeexzision:</u>	<u>histologischer Befund:</u>
6 Tage nach	kein Tumor,
Bestrahlung,	ausgedehnte Nekrosen
integral bestrahlter	
Bezirk	

Tab. 28 zeigt eine Zusammenstellung des histologischen Befunds der gesamten Blase nach Obduktion des Hundes; die genauen Bestrahlungsparameter der gesamten Therapie können dem vorhergehenden Text entnommen werden.

Tab. 28 Histologischer Befund nach Photoradiotherapie einer tumortragenden Hundeharnblase,
n = 1

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	1	gut erhalten	0
herdförmig	0	Reste	0
oberflächl.	0	kein	1
keine	0		

<u>normales Urothel:</u>		<u>Epithelotypen:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	0
vereinzelt	1	restweise	1
keines	0	keine	0

5.3.2 Integrale LASER-Bestrahlung tumorfreier Harnblasen
beim Hund

Als Kontrollversuche wurden zwei Beaglehunde von 13 und 14 Kg Körpergewicht 60 h bzw. 90 h nach HpD-Gabe integral bestrahlt.

Die Schleimhaut der Hundeharnblase zeigte nach LASER-Bestrahlung keine wesentlichen Schäden, die auf eine Wirkung des HpD zurückzuführen wären.

Die beiden Versuche werden in den folgenden Punkten getrennt dargestellt.

5.3.2.1 Integrale LASER-Bestrahlung einer tumorfreien Harn-
blase beim Hund. HpD-Inkubationszeit 90h

Der Hund wurde nach einer HpD-Inkubationszeit von 90 h mit einer Bestrahlungsdosis von $70 - 80 \text{ J/cm}^2$ integral bestrahlt. Der Hund wurde nach 8 Tagen eingeschläfert und seziiert. Tabelle 29 zeigt eine Zusammenstellung des histologischen Befunds der gesamten Blase nach Obduktion des Hundes.

Tab. 29 Histologischer Befund nach Photoradiotherapie einer tumorfreien Hundeharnblase. HpD-Inkubationszeit 90 h, Bestrahlungsdosis 70 - 80 J/cm², Streumedium-verdünnung 1:40,
n = 1

<u>Nekrosen:</u>		<u>Epitheldefekte:</u>	
ausgedehnt	0	kleinste	1
herdförmig	0	keine	0
oberflächl.	0		
keine	1		
 <u>normales Urothel:</u>			
ausgedehnt	1		
vereinzelt	0		
keines	0		

Die zusätzliche histologische Untersuchung der Vagina ergab keinerlei Anhalt für eine Schädigung des Epithels oder der tieferen Wandschichten.

5.3.2.2 Integrale LASER-Bestrahlung einer tumorfreien Harnblase beim Hund. HpD-Inkubationszeit 60 h

Der Versuch wurde analog der Bestrahlung von Punkt 5.3.2.1 durchgeführt. Infolge einer kurzzeitigen Überfüllung der Blase mit dem Streumedium, kam es durch einen Detrusorspasmus zur Entleerung der Blase und zu einem Lichtleiter-Schleimhautkontakt für ca 2 Minuten. Die Blasenschleimhaut zeigte in diesem Bereich makroskopisch einen etwa 1 cm im Durchmesser haltenden oberflächlichen Defekt. Inwieweit dieser Kontakt für eine bereits makroskopisch sichtbare Schädigung im Bereich einer benachbarten Darmschlinge verantwortlich war, konnte nicht mehr festgestellt werden.

Tabelle 30 zeigt die histologischen Befunde nach Photoradiotherapie einer tumorfreien Hundeharnblase.

Tab. 30 Histologischer Befund nach Photoradiotherapie einer tumorfreien Hundeharnblase. HpD-Inkubationszeit 60 h, Bestrahlungsdosis 70 - 80 J/cm², Streumediumverdünnung 1:40, n = 1

<u>Nekrosen:</u>		<u>erhaltenes Urothel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	1
oberflächl.	1	restweise	0
herdförmig	0	keines	0
keine	0		

Das betreffende Darmsegment zeigte histologisch eine bis auf die Lamina propria reichende herdförmige Nekrose.

Die Schleimhautbezirke der Harnblase zeigten abgesehen von dem Bereich um die Kontaktstelle keine pathologischen Veränderungen.

5.4 Ergebnisse der Untersuchung zu Veränderungen der Schleimhaut und der Oberflächentemperatur bei der Photoradiotherapie

5.4.1 Schleimhautveränderungen unmittelbar nach LASER-Bestrahlung HpD-photosensibilisierter Rattenblasentumoren

Um thermische Schäden der Schleimhaut nach Bestrahlung ausschließen zu können, wurden in dieser Serie 5 tumortragende Rattenblasen mit HpD-Inkubationszeiten von durchschnittlich 86 h und Bestrahlungsdosen von durch-

schnittlich 335 J/cm^2 zeilenförmig bestrahlt (siehe Punkt 4.5.1). Die Tiere wurden unmittelbar nach Bestrahlung getötet, die Blasen entnommen und zur histologischen Untersuchung gegeben.

Tabelle 31 zeigt eine Zusammenstellung der histologischen Ergebnisse.

Tab. 31 Übersicht über die histologischen Befunde nach zeilenförmiger Bestrahlung photosensibilisierter Blasentumoren der Rattenblase (Kurzzeitüberlebensdauer), $n = 5$

<u>Nekrosen:</u>		<u>Tumor:</u>	
ausgedehnt	0	gut erhalten	5
herdförmig	1	Reste	0
oberflächl.	1	kein	0
keine	3		
 <u>Carbonisierung:</u>			
ausgedehnt	0		
gering	0		
keine	5		

Keines der Tiere zeigte unmittelbar nach Bestrahlung irgendeine Veränderung, welche auf Grund zu starker Hitzewirkung als Eiweißdenaturierung oder Carbonisierung unmittelbar nach Bestrahlung erkennbar sein müßte.

5.4.2 Ergebnisse der Temperaturkontrolle mit einer AGA-Thermokamera während der LASER-Bestrahlung von Rattenharnblasen

Um den Temperaturverlauf während der Bestrahlung genauer analysieren zu können, wurden 3 Rattenblasen

unter der Kontrolle mit einer AGA-Thermokamera homogen bestrahlt. Die Erwärmung des Gewebes wurde während der Bestrahlung auf einem Farbmonitor verfolgt. (siehe Punkt 4.5.2)

Die Temperatur stieg während der Bestrahlung einheitlich um 3°C von einer Ausgangstemperatur von 20°C ausgehend, auf 23°C an und blieb während des gesamten Bestrahlungsvorganges auf diesem Temperaturniveau konstant. Während einer 7 minütigen Unterbrechung der Kühlung stieg die Temperatur nach etwa 3 min auf 25°C an und veränderte sich bis zum erneuten Einsetzen der Kühlung nicht mehr.

Auch die histologische Begutachtung der unmittelbar nach homogener Bestrahlung entnommenen Blasen ergab keinerlei Hinweis auf eine thermische Schädigung des Gewebes. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung sind aus Tabelle 32 zu ersehen.

Tab. 32 Histologische Veränderungen im Bestrahlungsfeld bei homogener Bestrahlung tumortragender und tumorfreier, nicht photosensibilisierter Rattenblasen (Temperaturkontrolle),

n = 3

<u>Nekrosen:</u>		<u>Erhaltenes Epithel:</u>	
ausgedehnt	0	ausgedehnt	3
oberflächl.	0	restweise	0
herdförmig	0	keines	0
keine	3		

6. DISKUSSION

6.1 Besprechung der Methodik

6.1.1 HpD

Ogbleich LIPSON und Mitarbeiter eine detaillierte Präparationsvorschrift zur Herstellung von HpD erarbeitet hatten (35, 38), erwiesen sich die von verschiedenen Autoren zubereiteten Präparate als uneinheitlich in ihrer Zusammensetzung und in ihren pharmakologischen und physikalischen Eigenschaften (17). Auch Alterungsprozesse bewirken eine Veränderung der Substanz, erkennbar an einer Verschiebung der spektrographisch und spektrofluorometrisch gemessenen Extinktions- und Emissionsbanden (53). Käuflich erwerbbares und standardisiertes HpD weist ebenfalls Unterschiede in der Wirksamkeit auf. Einzelne voneinander abweichende Ergebnisse der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche müssen wenigstens zum Teil auf die derzeit noch bestehenden qualitativen Unterschiede verschiedener HpD-Chargen zurückgeführt werden.

Eindeutige und bis in alle Einzelheiten reproduzierbare Versuchsergebnisse werden deshalb erst bei genauer Kenntnis der einzelnen wirksamen Bestandteile des "Stoffgemisches HpD" zu verwirklichen sein.

6.1.2 LASER-Systeme und Bestrahlungsmethoden

Das bei den tierexperimentellen Versuchen verwendete, normalerweise nur im Laboraufbau genutzte LASER-System hat sich für einen medizinisch-therapeutische Einsatz beim Menschen als bei weitem nicht ausgereift genug erwiesen.

Die Einhaltung einer exakten, über längere Zeit konstanten LASER-Leistung bedarf einer sehr aufwendigen und genauen Justierung der optischen Einrichtungen. Die genaue Abstimmung der optischen Systeme war besonders während der Bestrahlung eines Versuchstiers nicht immer möglich. Ein Leistungsabfall während der Bestrahlung bedingte die unabwendbare uneinheitliche Bestrahlungsdosis innerhalb einiger Versuchsserien. Sehr starke Leistungsschwankungen führten bei manchen Versuchen dazu, daß die Experimente abgebrochen werden mussten oder zumindest nur bedingt verwertbar waren. Auch die z.T. benötigte hohe Lichtleistung von etwa 2 Watt war nicht in allen Fällen sofort verfügbar.

Bei den Versuchen zur homogenen LASER-Bestrahlung mußte die Streulichtverteilung regelmäßig vor Beginn der Bestrahlung mit erheblichen technischen Aufwand neu vermessen werden. Ebenso musste die LASER-Ausgangsleistung, die zum Erreichen einer bestimmten Bestrahlungsdosis erforderlich war, neu berechnet werden. Ursache hierfür waren die sich oft verändernden Schwingungsmoden (Schwingungszustände) des Farbstoff-LASERS, und die daraus resultierende Änderung von Form und Größe des Lichtflecks. Änderungen der Schwingungsmoden während der Bestrahlung konnten nicht berücksichtigt werden. Die Narkose der Tiere hätte in solchen Fällen nicht um die zur Neujustierung und Vermessung benötigte Zeit verlängert werden können. Unter anderem aus diesen Gründen scheint das LASER-System in der experimentell genutzten Form für die Anwendung in der Klinik ungeeignet.

Farbstoff-LASER-Systeme, die wesentlich leichter

handzuhaben sind, sind mittlerweile erhältlich und erfüllen die für eine Anwendung in der Klinik erforderlichen Bedingungen. Diese Systeme arbeiten mit höheren Leistungen, ermöglichen eine Leistungskontrolle während der Bestrahlung mittels eines Strahlteilers und garantieren über eine elektronische Autoregulation der Ausgangsleistung die Einhaltung einer definierten Bestrahlungsdosis.

Die anfangs angewendete zeilenförmige Bestrahlung erwies sich hinsichtlich der angestrebten reproduzierbaren Therapieeffekte als ungünstig. Die Bestrahlungsdosis wurde flächenbezogen in Abhängigkeit von der Leistung des LASERS berechnet. Da die Leistung jedoch bei zeilenförmiger Bestrahlung von Hand ungleichmäßig über die bestrahlte Blase verteilt wurde, konnte eine Homogenität der Lichtverteilung auf der Blasenoberfläche bei dieser Methode nicht gewährleistet werden. Erst die homogene Bestrahlung durch Streuung des LASER-Lichtes an einer Mattscheibe ermöglichte eine gleichmäßige Verteilung der Bestrahlungsdosis. Auch die integrale Bestrahlung der mit einem Streumedium gefüllten Blase führte zu einer homogenen Lichtverteilung und ließ eine differenziertere Bewertung der Bestrahlungsergebnisse zu.

6.1.3

Chemisch induzierte Blasenkarzinome der Ratte

Chemisch mit Nitrosamin induzierte Blasenkarzinome der Rattenblase sind sich um echte urotheliale Blasenkarzinome, die in der Zusammensetzung der einzelnen histologischen Karzinomtypen dem menschlichen Blasenkarzinom vergleichbar sind. Auch bezüglich der Tumorstadien ergeben sich Parallelen zum menschlichen

Blasentumor. Mit diesem Modell standen alle Tumorstadien vom Carcinoma in situ bis zu exophytischen Tumoren und von nicht infiltrierend bis zu tief infiltrierend wachsenden Tumoren für experimentelle Überprüfungen unseres Therapiekonzepts zur Verfügung (32, 43). Bedingt durch die chemische Induktion der Tumoren war jedoch die Schleimhaut zumeist vollständig tumorös verändert. Die Abschätzbarkeit einer selektiven Schädigung der tumorösen Schleimhaut bei verbleibender gesunder Schleimhaut konnte deshalb nicht vorausgesetzt werden. Die Reste verbliebenen intakten Urothels waren auch bei der homogenen LASER-Bestrahlung nur sehr klein. Der deutlichere Nachweis einer tumorselektiven Gewebeschädigung könnte sich deshalb allenfalls anhand von Versuchen an Tumorblasen nach kürzeren Tumorinduktionszeiten, d.h. Tumoren früherer Entwicklungsstadien führen lassen.

Von Interesse war weiterhin, inwieweit bei der hohen Eindringtiefe des roten LASER-Lichts bei Blasen mit oberflächlichem Tumorwachstum eine selektive Schonung äußerer gesunder Blasenschichten zu erreichen war und ob diesbezüglich diese Tumoren als Modell für eine experimentelle Behandlung des Carcinoma in situ geeignet waren. Wie sich zeigte - hierauf wird nochmals einzugehen sein - gestattet das Modell des chemisch induzierten Rattenblasentumors eine Beantwortung der verschiedenen aufgeworfenen Fragen.

6.1.4

Transplantation und Wachstum von Brown-Pearce Tumoren

Bei diesem Tumor handelt es sich um einen undifferenzierten Tumor aus dem Bereich einer syphilitischen Läsion des Kaninchenhodens. Eine ausschließlich auf die Mukosa der Blasenschleimhaut beschränkte Trans-

plantation der Tumorzellsuspension ist bei Kaninchen infolge der Zartheit der Blasen nicht möglich. Es handelt sich also nicht um einen in allen Punkten dem menschlichen Urothelkarzinom vergleichbaren epithelialen Tumor. Der Brown-Pearce Tumor eignet sich deshalb nicht als Modell für oberflächlich wachsende Tumoren oder als Modell für das menschliche Carcinoma in situ. Der Brown-Pearce Tumor ist weiterhin charakterisiert durch ein außerordentlich schnelles Wachstum. Eine durch die rasche Proliferation des Tumors bedingte mangelhafte Gefäßversorgung führt in ca 50% zum Auftreten von zentralen Spontannekrosen des Tumors. Eine Mangelversorgung der Tumoren bedingt auch eine Verminderung des HpD-Angebots an die einzelne Tumorzelle. Der Brown-Pearce Tumor ist deshalb nur unter Vorbehalt als Modell zur LASER-Therapie des Blasenkarzinoms verwertbar.

Aus den eben beschriebenen Gründen war eine Beurteilung der photodynamischen Therapieeffekte anhand der Nekrosengröße bei diesen Experimenten nur eingeschränkt durchführbar. Lediglich eine vollständige Zerstörung des Tumors konnte als Therapieeffekt bewertet werden.

Die von der eigenen Arbeitsgruppe in vitro und in vivo ermittelten unterschiedlichen HpD-Speicherungsraten dieser Tumoren, die dazu führten, daß in Einzelfällen Tumoren überhaupt kein HpD anreicherten (53), stellen eine weitere mögliche Erklärung für die aufgezeigten negativen Ergebnisse einzelner Bestrahlungsversuche an Kaninchenblasen dar. Trotz der vorab besprochenen Einschränkung waren diese Transplantat-Tumoren bei Kaninchen, sieht man vom besonders aufwendigen Blasentumormodell beim Hund ab, daß einzig verfügbare, endoskopisch zugängliche Modell zur Erprobung einer transurethralen integralen LASER-Bestrahlung von Blasentumoren im Experiment.

6.1.5. Chemisch induziertes Blasenkarzinom beim Hund

Mit dem chemisch induzierten urothelialen Tumor der Hundeblase existiert ein Blasentumormodell, das die wichtigen Eigenschaften der beiden anderen Tumormodelle, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, in sich vereint. Es handelt sich um echte urotheliale Tumoren, z.T. mit oberflächlichem, z.T. mit invasivem Wachstum neben dem parallel vorhandenen Carcinoma in situ. Beim Hund ist die Blase im Gegensatz zu den anderen Tumormodellen endoskopisch gut zugänglich (24). Von Nachteil sind bei diesem Tumormodell eine lange Induktionsdauer von 13 - 24 Monaten und die damit verbundenen hohen Kosten der Tierhaltung. Innerhalb dieser Arbeit war lediglich ein Hund, der uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Harzmann von der Urologischen Klinik der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt wurde, als Tumortier zur experimentellen Photoradiotherapie verfügbar.

6.2 Besprechung der Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Rattenblasen

6.2.1 Zeilenförmige Bestrahlung von Rattenblasen

6.2.1.1 Einfluß verschiedener HpD-Applikationsformen

Da sich die allgemein übliche intravenöse Injektion in die Schwanzvene der Ratte bei einer undurchsichtigen Substanz wie HpD als sehr schwierig erwies - paravenös

gelaufenes HpD überlagerte sofort die Gefäße und machte eine weitere Injektion unmöglich - wurde zu Beginn der Versuche HpD intraperitoneal injiziert. Trotz einer Verkürzung der HpD-Inkubationszeit und einer Erhöhung der Bestrahlungsdosis im Laufe dieser Versuchsserie konnten keine befriedigenden Therapieergebnisse erzielt werden (siehe Tab.4). In Anlehnung an die Beobachtung von CARPENTER, der von einer stärkeren Fluoreszenz nach intravenöser Injektion von HpD berichtete (7), wurde HpD nach Auswertung dieser Versuchsserie intravenös gegeben. Die Injektion erfolgte in die freipräparierte Vena saphena. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse der Bestrahlung erheblich verbessert werden. Die Blasenschleimhaut wies in etwa dem gleichen Maß deutliche Nekrosen auf, in dem eine Tumorrogression erreicht wurde (Tab. 5). Auch eine gewisse Selektivität konnte bei dieser Form der Bestrahlung erreicht werden. So war innerhalb dieser Serie in zwei von 15 Fällen bei einer deutlichen Zerstörung des Tumors noch normales Urothel erkennbar. Dieses entsprach dem Anteil an normalem Urothel in unbehandelten Tumormblasen.

6.2.1.2 Auswirkungen der ungleichmäßigen LASER-Lichtverteilung bei zeilenförmiger Bestrahlung

Die unvollständige Tumorerstörung bei zeilenförmiger Bestrahlung ist, wie ein Vergleich mit der homogenen Bestrahlung der Tumormblasen gezeigt hat, auf eine ungleichmäßige Verteilung des LASER-Lichtes auf der Blasenschleimhaut zurückzuführen. Die Bestrahlungsbedingungen waren bei der zeilenförmigen Bestrahlung sehr schwer kontrollierbar. Einheitliche Versuchsbedingungen waren mit dieser Bestrahlungsmethode nicht erzielbar. Sie konnten deshalb nur als Vorversuche zur Erarbeitung besserer Bestrahlungstechniken dienen und

verstanden werden. Eine erste Abschätzung des Verhaltens HpD photosensibilisierter Tumoren auf die therapeutisch eingesetzte LASER-Bestrahlung war jedoch möglich. So war eine Abhängigkeit der Bestrahlungswirkung von der HpD-Inkubationszeit zu erkennen. Nach einer 58- stündigen HpD-Inkubationszeit ist die Tumorregression trotz einer geringeren Bestrahlungsdosis stärker ausgeprägt als nach einer Inkubationszeit von 133 Stunden. Korrespondierend verkleinerte sich das Ausmaß der Nekrosen nach Verlängerung der HpD-Inkubationszeit erheblich (vergleiche Tab. 7 und Tab. 8). Eine eindeutige Abhängigkeit des Therapieeffekts von der Bestrahlungsdosis war bei dieser Versuchsanordnung jedoch noch nicht erkennbar.

6.2.2

Homogene LASER-Bestrahlung nicht infiltrierend wachsender Blasentumoren der Ratte

Nach den Erkenntnissen, die aus den Versuchen zur zeilenförmigen LASER-Bestrahlung der Rattenblasen gewonnen werden konnten, wurden alle weiteren Bestrahlungsversuche an Rattenblasen mit einer intravenösen Injektion von HpD und homogen gestreutem LASER-Licht durchgeführt.

Um einen direkten Vergleich zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Blasenepithel durchführen zu können, wurde ein Teil der Rattenblase zum Schutz vor der Lichteinwirkung während der Bestrahlung mit einer Schablone abgedeckt. Mit dieser Bestrahlungsmethode war es möglich, unter kontrollierten, messbaren Bedingungen nicht infiltrierende Blasentumoren der Rattenharnblase vollständig zu zerstören (vergleiche Tab.11). Auch die Steigerung der tumorselektiven photodynamischen Wirkung gegenüber der zeilenförmigen Bestrahlung wird durch die homogene Bestrahlung möglich. Bei der zeilenförmigen Bestrahlung war in 2 von 15

Fällen (6.7 %), bei der homogenen Bestrahlung dagegen in 4 von 8 Fällen (50 %) intaktes Urothel verblieben (vergleiche Tab.5 und Tab.11). Die Nekrosen beschränkten sich auf das Blasenurothel und hatten sehr spezifisch lediglich maligne entartetes Schleimhautgewebe erfasst. Reste von normalem Urothel und in einem Fall auch ein winziger Rest von atypischem Epithel waren in etwa dem gleichen Ausmaß wie außerhalb des Bestrahlungsfeldes zu erkennen.

Eine tumorselektive photodynamische Gewebeerstörung schien auch in Hinsicht auf äußere Schichten der Blase gegeben zu sein. Nur bei infiltrierend wachsenden Tumoren waren in Einzelfällen auch Nekrosen der Muskelschichten der Blase erkennbar. Bei allen anderen Versuchen waren die äußeren Schichten der Blase vollständig unversehrt geblieben.

Die Schonung gesunden Urothels konnte durch eine Verlängerung der HpD-Inkubationszeit von 17 h auf 55 h noch gesteigert und so die Tumorselektivität dieser Bestrahlungsmethode noch verbessert werden. In der Versuchsgruppe "5.1.2.1.2" wurde in allen Fällen innerhalb der Bestrahlungsfelder noch normales Urothel gefunden. Die Tatsache, daß hier in einem Fall auch noch ein intakter Tumor vorhanden war ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß bei einer HpD-Inkubationszeit von 55 h bei der Ratte sich die Photosensibilisierung aller Tumoranteile einem oberen Grenzwert nähert (siehe Tab. 14).

6.2.3

Homogene LASER-Bestrahlung infiltrierend wachsender
Blasentumoren der Ratte

Wie die Ergebnisse der homogenen Bestrahlung infiltrierend wachsender Tumoren nahelegen, ist die Photoradiotherapie bei fortgeschrittenen Tumorstadien der Rattenblase nicht erfolgreich. Der Versuch, die selektive Erhaltung gesunder, nicht maligne veränderten Urothels durch eine Senkung der Bestrahlungsdosis auf 30 J/cm^2 zu verbessern, scheiterte bei infiltrierendem Tumorstadium völlig. Die Versuche der Gruppe "5.1.2.2" wurden alle gleichzeitig durchgeführt, ohne daß zwischenzeitlich bereits histologische Befunde erhältlich gewesen wären. So war auch nicht abzusehen gewesen, daß eine Erhöhung der Dosis von 30 J/cm^2 auf 150 J/cm^2 keine Verbesserung der Bestrahlungseffekte brachte. Als Ursache für das Scheitern dieser Versuche müssen folgende Faktoren als verantwortlich diskutiert werden:

1. Tumoren mit großer Tumormasse bzw. rascher Progredienz speichern möglicherweise HpD in geringerer Konzentration als Carcinomata in situ oder polypöse, nicht infiltrierende Tumoren der Harnblase. Anhaltspunkte für diese Tatsache beschrieben bereits Kelly und Mitarbeiter 1976 (29).

2. Die bei den Tumoren der Gruppe "5.1.2.2" beschriebenen, als Spontannekrosen gedeuteten Gewebeerstörungen weisen auf eine Mangelversorgung der Tumoren hin, so daß diese Tumoren anscheinend nicht ausreichend mit HpD versorgt, d.h. photosensibilisiert werden konnten.

3. Die Wandstärke der Rattenharnblase beträgt bei Tumoren infiltrativen Wachstums ein Vielfaches der Wandstärke der Harnblase bei nichtinfiltrierendem Wachstum und verzögert deshalb eine eventuelle Diffusion von HpD aus den Gefäßen in das Tumorgewebe.

Konsequenzen, die sich hieraus für eine befriedigende Therapie von Tumoren infiltrativen Wachstums ergeben könnten, wären die Verabreichung höherer HpD-Dosen und die Einhaltung längerer HpD-Inkubationszeiten. Hiermit ließe sich eventuell erreichen, daß das HpD auch über eine längere Diffusionsstrecke in ausreichendem Maß in das Tumorgewebe gelangen kann. Sollte dies Angesichts fixer Serumhalbwertszeiten nicht ausreichen, könnte eventuell eine kurzfristig wiederholte HpD-Verabreichung zum Erfolg führen.

6.2.4

Kontrollversuche zur Photoradiotherapie tumortragender Rattenblasen

Die Versuche der therapeutischen Bestrahlung von tumortragenden Rattenblasen mit LASER-Licht und vorhergehender Photosensibilisierung mit HpD hatten gezeigt, daß es unter bestimmten Voraussetzungen möglich ist, mit der Photoradiotherapie (PRT) Tumoren der Rattenharnblase vollständig und aller Voraussicht nach selektiv zu zerstören.

Daß diese Therapiewirkung nur im Fall eines Tumorgeschehens bei der Kombination selektiv gespeicherter, photosensibilisierender Substanzen mit der Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlängen und Intensität auftritt, sollte anhand der Kontrollversuche gezeigt werden.

Hierzu mußten vor allem folgende Forderungen gestellt und anhand der Kontrollversuche bestätigt werden:

1. Alleinige LASER-Bestrahlung bewirkt keine Tumorzerstörung und verursacht keine Nekrosen.

Eine thermische Schädigung des Gewebes durch homogene LASER-Bestrahlung muß ebenfalls ausgeschlossen werden.

2. Gesundes, nicht photosensibilisiertes Gewebe darf durch das LASER-Licht nicht geschädigt werden.

3. Nur eine gegenüber gesundem Blasengewebe deutlich verzögerte HpD-Ausscheidung aus malignem Blasengewebe bietet genügend Spielraum für eine selektive photodynamische Zerstörung von Blasentumoren.

4. HpD alleine, ohne zusätzliche LASER-Lichteinwirkung darf keine Gewebeschädigung verursachen.

Zu 1.: Weder die zeilenförmige, noch die alleinige homogene LASER-Bestrahlung nicht photosensibilisierter Rattenblasen ließ eine Tumorregression erkennen (siehe Tab. 9 und Tab. 19).

Die oberflächlichen Nekrosen, die bei der zeilenförmigen Bestrahlung nicht HpD-photosensibilisierter Kontrolltiere auftraten, waren wesentlich geringer und in keiner Weise vergleichbar mit den oberflächlichen Nekrosen, die bei der Behandlung photosensibilisierter Tumoren auftraten. Bei der homogenen Bestrahlung nicht photosensibilisierter Kontrolltiere traten diese Nekrosen überhaupt nicht auf. (Versuche 5.1.1.3.1, 2, und 5.1.2.3.1)

Eine Nekrosebildung oder Karbonisierung des Gewebes durch eine thermische Wirkung des LASER-Lichts konnte durch die Versuche 5.4.1 und 5.4.2 ausgeschlossen werden.

Zu 2.: Gesundes, nicht photosensibilisiertes Blasengewebe der Ratte wurde in den bei der PRT üblichen Dosisbereichen durch die alleinige LASER-Bestrahlung (630 nm) nicht geschädigt. Der Schwellenwert für die Schädigung der Blasenschleimhaut durch rotes LASER-Licht der Wellenlänge 630 nm scheint zwischen 700 J/cm^2 und 1000 J/cm^2 zu liegen (vergleiche Tab. 10 und Tab. 21), d.h. bei Dosen, die die bei der PRT der Rattenharnblase verwendeten erforderlichen Werte weit übersteigen.

Zu 3.: HpD-photosensibilisierte, tumorfremde Rattenblasen wiesen nach Bestrahlung keine klinikrelevanten Schädigungen auf, während bei HpD-photosensibilisierten, zu exakt denselben Bedingungen bestrahlten tumortragenden Rattenblasen eine vollständige Zerstörung der maligne entarteten Schleimhaut erreicht werden konnte. Eine deutliche Schädigung des mit HpD-photosensibilisierten, gesunden Blasengewebes tritt nur bei Bestrahlung bis etwa 6 h nach HpD-Gabe auf. Photosensibilisierte, nicht infiltrierend wachsende Tumoren, werden bei annähernd gleicher Bestrahlungsdosis, sieht man von einem einzigen Therapieversager ab, auch noch nach einer 55 h HpD-Inkubationszeit vollständig zerstört. (siehe Tab.14).

Diese Unterschiede sind offensichtlich auf eine deutlich längere Speicherung des HpD im Tumorgewebe zurückzuführen. Alle anderen Parameter wie Stamm, Alter und Geschlecht der Tiere sowie die Art und Weise der Bestrahlung waren bei diesen Versuchen unverändert geblieben und scheiden deshalb als Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse aus.

Zu 4.: Eine eventuelle Schädigung des Gewebes durch HpD ohne Lichteinwirkung konnte durch die Ergebnisse homogener LASER-Bestrahlung ausgeschlossen werden. Mit HpD inkubierte, tumorhaltige und tumorfreie Bezirke der Blase waren während der homogenen LASER-Bestrahlung durch eine Schablone vor der Einwirkung des LASER-Lichtes geschützt gewesen. In diesem Bereich war keine Veränderung, die auf eine gewebezerstörende Wirkung von HpD ohne die Mitwirkung von LASER-Bestrahlung schließen läßt, erkennbar.

Blasentumoren der Ratte waren in diesen Versuchsreihen eindeutig selektiv zu zerstören.

Das nach chemischer Induktion der Tumoren spärlich verbliebene nicht maligne Urothel und die tieferen Schichtep der Blase wurden hierbei geschont.

Diese Ergebnisse erscheinen nur durch das Zusammenwirken folgender Wirkprinzipien möglich:

1. Blasentumoren speichern HpD in einer Konzentration, die eine Tumorerstörung durch eine niederenergetische Farbstoff-LASER-Bestrahlung zuläßt.

2. HpD bewirkt ohne Anregung durch Licht geeigneter Wellenlänge keine Gewebeerstörung unabhängig davon, ob es sich um Tumorgewebe oder um normales Gewebe handelt.

3. Die Farbstoff-LASER-Bestrahlung bei 630 nm bewirkt - ohne vorherige Photosensibilisierung des Gewebes durch HpD - weder bei tumorhaltigem noch bei gesundem Blasengewebe eine Gewebeerstörung.

4. Eine LASER-Bestrahlung gesunden, mit HpD vorbehandelten Gewebes zerstört das Gewebe nur bis etwa 6 h nach der Photosensibilisierung. Nach einer 12 - stündigen HpD-Inkubationszeit und anschließender LASER-Bestrahlung treten keine wesentlichen Schäden am Gewebe auf.

5. Photosensibilisiertes Tumorgewebe ist auch nach einer 55 - stündigen HpD-Inkubationszeit noch zu zerstören, d.h. Blasen Tumoren speichern HpD in photodynamisch wirksamer Konzentration bedeutend länger als gesundes Blasengewebe.

6. Nur HpD-photosensibilisierte Blasenkarzinome können durch die LASER-Bestrahlung (630 nm) zerstört werden. Nicht photosensibilisierte Blasen Tumoren bleiben unbeschädigt.

6.3 Besprechung der Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Kaninchenblasen

6.3.1 Zeilenförmige LASER-Bestrahlung tumortragender photosensibilisierter Kaninchenblasen

Die zeilenförmige LASER-Bestrahlung photosensibilisierter tumortragender Kaninchenblasen erbrachte im Prinzip ähnliche Ergebnisse wie die zeilenförmige Bestrahlung von Rattenblasen. Die Tumoren konnten auch hier zum Teil vollständig zerstört werden. Ausgedehnte Nekrosen waren neben erhaltenem Urothel vorhanden.

Die Nekrosen waren jedoch nicht als alleinige Bestrahlungsfolge zu bewerten. 50 % aller Tumoren hatten bereits vor Bestrahlung spontan aufgetretene zentrale Nekrosen. Diese Nekrosen waren auf den spontanen Zerfall dieser Tumoren zurückzuführen. Zum Teil könnte auch eine Schädigung der Blasenwand durch Injektion der Tumorzellsuspension für die Nekrosen mitverantwortlich gewesen sein. Nicht berücksichtigt sind bei der Angabe von 50 % diejenigen Tiere, die auf Grund vollständig oder sehr ausgedehnt nekrotischer Tumoren nicht für die Versuche verwendet wurden.

Bezüglich der HpD-Speicherung dieser Tumoren mußten ähnliche Überlegungen angestellt werden, wie bei infiltrierend wachsenden Tumoren der Rattenblase:

1. Die Dicke der Tumoren überstieg in vielen Fällen die normale Wandstärke der Blase bei weitem und erschwerte so möglicherweise die HpD-Versorgung der Tumoren.

2. Das schnelle Wachstum der Tumoren, das zum Auftreten von Spontannekrosen infolge mangelnder Versorgung dieser Tumoren führte, bot zwei weitere Erklärungsmöglichkeiten für eine nicht ausreichende Versorgung dieser Tumoren mit HpD:

Zum einen wächst der Tumor nach HpD-Verabreichung noch weiter, während ein Teil des HpD bereits wieder ausgeschieden ist. Den raschen Abfall der HpD-Serumkonzentration zeigen Messungen mit radioaktiv markiertem HpD bei Mäusen. Hier sank die HpD-Konzentration im Blut nach 48 h auf etwa den zehnten Teil der Ausgangskonzentration ab (19). Insofern standen für eine Photosensibilisierung von neugebildeten Tumoranteilen geringere HpD-Spiegel zur Verfügung, d.h. neu gewachsenes Tumorgewebe weist aller Voraussicht nach nicht die gleiche HpD-Sättigung wie der Tumor auf, der zur Zeit hoher HpD-Serumspiegel bereits vorhanden war.

Zum anderen bewirkt eine mangelnde Gefäßversorgung auch eine mangelnde Versorgung des Tumorgewebes mit HpD.

In guter Übereinstimmung hierzu konnte deshalb bei Messungen zur HpD-Speicherung in Tumoren auch nur in etwa 30 % eine ausreichende HpD-Konzentration im Tumorgewebe festgestellt werden (53).

Eine differenzierte Aussage über die Effizienz der PRT, wie sie bei der homogenen Bestrahlung tumortragender Rattenblasen gemacht werden konnte, war deshalb bei Brown-Pearce Tumoren nicht möglich.

Unterschiede der Therapieeffekte nach Bestrahlung mit verschiedenen Bestrahlungsdosen und unterschiedlichen HpD-Inkubationszeiten waren auch wegen der geringen Fallzahl der Versuche nur tendenziös erkennbar. Bei Bestrahlungsdosen, die sich zwischen Werten von 60 J/cm^2 und 80 J/cm^2 bewegten, waren auch keine großen Unterschiede zu erwarten. Die wichtigste Fragestellung für dieses Tumormodell lautete, ob es nach Berücksichtigung aller, für dieses Tumormodell bekannten Vorbehalte möglich war, durch eine transurethral integrale Ausleuchtung der mit einem Streumedium gefüllten Blase, Tumoren selektiv zu zerstören.

6.3.2

Integrale LASER-Bestrahlung tumortragender photosensibilisierter Kaninchenblasen

Die Therapieergebnisse der integralen LASER-Bestrahlung von Brown-Pearce Tumoren glichen in etwa denen nach zeilenförmiger Bestrahlung. Deutlich erhöhte sich bei der endoskopisch-transurethralen integralen Bestrahlung jedoch der Anteil intakt gebliebenen Urothels, während schon makroskopisch sichtbar die Nekrosen auf bestimmte Areale beschränkt geblieben waren (vergleiche Tab. 24 u. 25).

Hier bestätigt sich die schon bei der homogenen LASER-Bestrahlung von Rattenblasentumoren gewonnene Erkenntnis, daß mit einer gleichmäßigen Ausleuchtung aller Gewebeanteile und der damit verbundenen Vermeidung von Leistungsspitzen eine bessere Schonung der gesunden Schleimhaut erreicht wird. Die Bestrahlung tumortragender, nicht photosensibilisierter Kontrolltiere zeigte keine vergleichbare Tumordestruktion (Versuch 5.2-3).

Da es sich bei dem in diesen Versuchen verwendeten Streumedium um eine nicht toxische, zur parenteralen Ernährung beim Menschen verwendeten Fettemulsion handelt, ist es unwahrscheinlich, daß eine Tumordestruktion auf eine Wirkung dieser Fettemulsion zurückzuführen ist. Eine toxische Wirkung der Kombination Streumedium - LASER-Bestrahlung konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Nekrosen nur auf tumortragende Areale beschränkt blieben. Hierfür spricht besonders eindeutig die Beobachtung, daß gesundes Blaseschleimhautgewebe durch die integrale LASER-Bestrahlung nahezu ausnahmslos nicht geschädigt wurde (siehe Versuch 5.2.2).

Folgende Erkenntnisse lassen sich anhand der Photoradiotherapie photosensibilisierter Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase gewinnen:

1. Brown-Pearce Tumoren sind nur bedingt als Modell für eine Photoradiotherapie des Blasenkarzinoms mit HpD und LASER-Licht verwendbar.
2. Trotz der Unzulänglichkeit dieses Tumormodells läßt sich die Tendenz erkennen, daß auch größere Tumoren der Harnblase, sofern sie HpD speichern, durch die PRT mit HpD und LASER-Licht selektiv zerstörbar sind.

3. Berücksichtigt man die Einschränkungen, die dieses Tumormodell mit sich bringt, ist eine endoskopische Tumorzerstörung möglich. Die integrale LASER-Bestrahlung der mit einem Streumedium gefüllten Harnblase führt zu einer Zerstörung makroskopischer Tumorteile.

6.4 Besprechung der Ergebnisse der Bestrahlungsversuche an Hunde-Harnblasen

6.4.1 Integrale LASER-Bestrahlung chemisch induzierter Blasentumoren des Hundes

Die Bestrahlung von chemisch induzierten Blasentumoren beim Hund hat gezeigt, daß auch ausgedehnte Tumoren der Harnblase durch die Photoradiotherapie erfolgreich behandelt werden können. Eine Nekrosetiefe, die teilweise bis 8 mm in die Blasenwand reichte, spricht für eine ausreichende Eindringtiefe des roten LASER-Lichts. Eine genügende Tiefenwirkung der photodynamischen Therapie ist deshalb auch bei der Behandlung von Blasen, deren Stärke die Wanddicke bei Ratten und Kaninchenblasen übersteigt, gegeben.

Sowohl beim Tumor der Rattenblase wie auch der Hundebase zeigt sich, daß der photodynamische Effekt des LASER-bestrahlten photosensibilisierten Tumors nicht unmittelbar nach der Behandlung, sondern erst nach Stunden bzw. Tagen histologisch sicher erkennbar wird (5.4.1 und 6.4).

Im Gegensatz zu Brown-Pearce Tumoren der Kaninchenblase liegt beim Hund ein Blasentumor (G II - III) multilokulären Wachstums vor, der einer experimentell endoskopischen Behandlung besser zugänglich ist. Der größere Durchmesser der Harnröhre eines weiblichen Hundes erlaubt auch das Einführen von kaliberstärkeren Zystoskopen (Charr. 17 gegenüber Charr. 13 bei der

Kaninchenblase). Durch diese stärkeren Zystoskopschäfte können Vorrichtungen, die einen Schutz der Blase vor dem Kontakt mit der Spitze des Lichtleiters und eine Verbesserung der Streuverhältnisse für das LASER-Licht in der Blase erlauben, ins Blasenlumen vorgeschoben werden. Solche Vorrichtungen sind z.B. Körbchenkatheter mit eingebauten Reflektoren. Bei einer Verwendung von Körbchenkathetern können durch das in der Blase entfaltbare gitterartige Körbchen aus Kunststoff die Blasenwand von der Spitze des Lichtleiters entfernt gehalten und so Perforationen und Verbrennungen der Schleimhaut vermieden werden.

6.4.2

Integrale LASER-Bestrahlung tumorfreier Hundeharnblasen

Die integrale LASER-Bestrahlung tumorfreier Blasen des Hundes zeigt, daß 60 h bzw. 90 h im Anschluß an die HpD-Injektion bei einer LASER-Bestrahlung mit therapeutischen Strahlendosen keine nennenswerte Schädigung des Blasengewebes zu beobachten ist. Die bei diesen Versuchen aufgetreten punktförmigen, selten größeren, scharf begrenzten Nekrosen sind auf unkontrollierte Schleimhautkontakte mit dem Lichtleiter während der Bestrahlung zurückzuführen. Die auch im Kontrollversuch beobachteten, oberflächlichen erosiven Mukosa-Defekte sind durch das Einführen des Zystoskops und eine damit verbundene Verletzung oberflächlichster Schleimhautschichten erklärbar und ihrem geringen Schweregrad nach sicher ohne klinische Relevanz.

In Zusammenschau aller experimentellen Ergebnisse läßt sich feststellen, daß ein Beitrag zur Entwicklung und zur experimentellen Absicherung der Photoradiotherapie von Blasentumoren geleistet werden konnte.

Die integrale PRT des Blasenkarzinoms stellt sich als eine aussichtsreiche Behandlungsmethode dar, welche eine derzeit noch bestehende therapeutische Lücke bei der Behandlung des Blasenkarzinoms schließen könnte.

In dieser Arbeit konnte durch die Versuche an verschiedenen tumortragenden und tumorfreien Blasengeweben gezeigt werden, daß experimentelle Blasentumoren durch die Photoradiotherapie mit HpD und LASER-Licht selektiv zu zerstören sind. Ausgenommen werden müssen hiervon Tumoren, die auf Grund zu schnellen Wachstums oder infolge mangelnder Gefäßversorgung kein oder nicht genügend HpD speichern und somit nicht ausreichend photosensibilisiert sind.

Gesundes Blasengewebe wird bei der therapeutisch genutzten LASER-Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 630 nm durch die zur Therapie benötigten Bestrahlungsdosen nicht geschädigt.

HpD allein, d.h. ohne die Einwirkung von Licht, zeigt keine schädigende Wirkung auf das Gewebe.

Sowohl das urotheliale Carcinoma in situ als auch exophytisch wachsende Tumoren sind photodynamisch therapierbar.

Ebenso können bei günstigen Bedingungen auch undifferenzierte, nicht epitheliale Brown-Pearce-Transplantat-Tumoren erfolgreich behandelt werden.

Eine endoskopische Anwendung der LASER-Photoradiotherapie in der Blase ist möglich.

Die homogene oder integrale LASER-Bestrahlung erscheint gegenüber einer gerichteten oder zellenförmigen LASER-Bestrahlung therapeutisch effektiver.

Diese Ergebnisse untermauern die Hoffnung, daß das Blasenkarzinom durch eine integrale Photoradiotherapie umfassender und in früheren Tumorstadien therapierbar sein wird und somit besser als mit herkömmlichen Therapiemethoden behandelbar ist.

Die mit einer sicheren Erfassung aller Tumoranteile möglich erscheinende Senkung der Rezidivquote des Blasenkarzinoms und die ihrem Konzept nach wenig invasive, schonendere Behandlungsmethode lassen dieses Therapiekonzept in Zukunft als vielversprechend erscheinen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Auler, H.; Banzer, G.:
Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei
geschwulstkranken Menschen und Tieren.
Z. für Krebsforschung 53, 65-68 (1942)
2. Benson, R.; Farrow G.M.; Kinsey J.H.;
Cortese D.A.; Zincke H.; Utz D.C.:
Detection and localization of in situ carcinoma
of the bladder with HPD.
Mayo Clinic Proc. 57, 548-555 (1982)
3. Berenbaum, M.C.; Bonnett, R.; Scourides, P.A.:
In vivo biological activity of the components of
hematoporphyrin derivative.
Br. J. Cancer 45, 571-581 (1982)
4. Bonnett, R.; Ridge, R.J.; Scourides, P.A.;
Berenbaum, M.C.:
On the nature of hematoporphyrin derivative .
J.Chem.Soc. Perkin I, 3135-3140 (1981)
5. Brown, W.H.:
Studies based on a malignant tumor of a rabbit I.
J. exp. med. 37, 601-629 (1923)
6. Buettner, G.R.; Oberley, L.W.:
The apparent production of superoxide and
hydroxyl radicals by hematoporphyrin and light as
seen by spin-trapping.
FEBS Letters 121 (1), 161-164 (1980)
7. Carpenter, R.J.; Ryan, R.J.; Neel, H.B.;
Sanderson, D.R.:
Tumorescence with hematoporphyrin derivative
Ann. otol. rhino. laryng. 86 (51), 661-666 (1977)

8. Cortese, D.A.; Kinsey, J.H.; Woolner, L.B.;
Payne, W.S.; Sanderson, D.R.; Fontana, R.S.:
Clinical Application of a new endoscopic
technique for detection of in situ bronchial
carcinoma.
Mayo Clin. Proc. 54, 635-642 (1979)
9. Cortese, D.A.; Kinsey, J.H.:
Endoscopic management of lung cancer with
hematoporphyrin derivative phototherapy.
Mayo. Clin. Proc. 57, 543-547 (1982)
10. Dahlman, A.; Wile, A.G.; Burns, R.G.; Mason, G.R.;
Johnson, F.M.; Berns, M.W.:
Laser photoradiation therapy of cancer.
Cancer Res. 43, 430-434 (1983)
11. Doiron, D.R.; Profio, E.; Vincent R.G.;
Dougherty, T.J.:
Fluorescence bronchoscopy for detection of lung
cancer.
Chest. 76, 27-32 (1979)
12. Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E.; Goldfarb, A.;
Weishaupt, K.R.; Boyle, D.; Mittleman, A.:
Photoradiation therapy for the treatment of
malignant tumors.
Cancer Res. 38 (8), 2638-2645 (1978)
13. Dougherty, T.J.:
Photoradiation therapy for cutaneous and
subcutaneous malignancies.
J. of Invest. Derm. 77 (1), 122-124 (1981)
14. Dougherty, T.J.; Lawrence, G.; Kaufman, J.E.;
Boyle, D.; Weishaupt, K.R.; Goldfarb, A.:
Photoradiation in the treatment of recurrent
breast carcinoma.
J. Nat. Cancer Inst. 62 (2), 231-237 (1979)

15. Dougherty, T.J.; Thoma, R.E.; Boyle, D.G.;
Weishaupt, K.R.:
Interstitial photoradiation therapy for primary
solid tumors in pet cats and dogs.
Cancer Res. 41, 401-404 (1981)
16. Dougherty, T.J.; Grindey, G.B.; Fiel, R.;
Weishaupt, K.R.; Boyle, D.G.:
Photoradiation therapy II. Cure of animal tumors
with hematoporphyrin and light.
J. Nat. Cancer Inst. 55, 115-121 (1975)
17. Dougherty, T.J.:
Variability in hematoporphyrin derivative
preparations.
Cancer Res. 42, 1032-1034 (1982)
18. Figge, F.H.J.; Weiland, G.S.;
Manganiello, L.O.J.:
Cancer detection and therapy, affinity of
neoplastic, embryonic, and traumatized tissue for
porphyrins and metalloporphyrins.
Proc. Soc. Exp. Biol. 68, 640-641 (1948)
19. Gomer, Ch.J.; Dougherty, T.J.:
Determination of (^3H)-and (^{14}C)
hematoporphyrin derivative distribution in
malignant and normal tissue.
Cancer Res. 39, 146-151 (1979)
20. Gray, M.J.; Lipson, R.; van S. Maeck, J.;
Parker, L.; Romeyn, D.:
Use of hematoporphyrin derivative in detection and
management of cervical cancer.
Ann. J. Obst. Gyn. 99, 766-771 (1967)

21. Gregorie, H.B.; Hoerger, E.O.; Ward, J.L.;
Green, J.F.; Richards, R.; Robertson, H.C.;
Stevenson, T.B.:
Hematoporphyrin derivative fluorescence in
malignant neoplasms.
Ann. Surg. 167, 820-828 (1968)
22. Hariharan, P.V.; Courtney, J.; Eleczko, S.:
Production of hydroxyl radicals in cell systems
exposed to haematoporphyrin and red light.
Int. J. Radiat. Biol. 37, (6), 691-694 (1980)
23. Harzmann, R.; Gericke, D.; Bichler, K.H.;
Erdmann, D.:
Transurethral transplantiertes Modell eines
Karzinoms im Bereich der Harnblase des
Kaninchens.
Urologe A 17, 125-129 (1978)
24. Harzmann, R.; Gericke, D.; Altenähr, E.;
Bichler, K.H.:
Chemische Induktion transplantabler
Harnblasenurothel-Karzinome des Hundes.
Urol. Int. 35, 340-350 (1980)
25. Hayata, Y.; Kato, H.; Konaka, C.; Ono, J.;
Takizawa, N.:
Hematoporphyrin derivative and laser
photoradiation in the treatment of lung cancer.
Chest 81 (3), 269-277 (1982)
26. Jocham, D.; Staehler, G.; Chaussy, Ch.;
Hammer, C.; Löhrs, U.:
Laserbehandlung von Blasentumoren nach
Photosensibilisierung mit
Hämatoporphyrin-Derivat -
Erste experimentelle Erfahrungen.
Urologe A 20, 340-343 (1981)

27. Jocham, D.; Hammer, C.; Loehrs, U.; Staehler, G.;
Chaussy, Ch.; Dietrich, R.:
Farblasertherapie photosensibilisierter
Blasentumoren.
Chir. Forum '82, 127-129
Hrsg. S. Weller, Springer Verlag
Berlin-Heidelberg-New York (1982)

28. Jocham, D.; Staehler, G.; Chaussy, Ch.;
Unsöld, E.; Hammer, C.; Löhrs, U.; Gorisch, W.:
Integral dye-laser irradiation of photosensitized
bladder tumors with the aid of a light-scattering
medium.
The Clayton Foundation. Symposium on porphyrin
localization and treatment of tumors.
Hrsg. D. Doiron, Alan R. Liss, New-York (1984) im
Druck

29. Kelly, J.F.; Snell, M.E.:
Hematoporphyrin derivative: A possible aid in the
diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder.
J. Urol. 115, 150-151 (1976)

30. Kinsey, J.H.:
Photodynamic effect of hematoporphyrin derivative
as a function of optical spectrum and incident
energy density.
Cancer Res. 41, 5020-5026 (1981)

31. Körbler, J.:
Rote Fluoreszenz in Krebsgeschwüren.
Strahlentherapie 43, 317-326 (1932)

32. Kunze, E.:
Transformationsstadien bei der Entwicklung von
Transitionalzell-Karzinomen der Rattenharnblase.
Habilitationsschrift, Göttingen (1975)

33. Laws, E.R.; Cortese, D.A.; Kinsey, J.H.;
Eagan, R.T.; Anderson, R.E.:
Photoradiation therapy in the treatment of
malignant brain tumors : A phase I (feasibility)
study.
Neurosurgery 9 (6), 672-678 (1981)
34. Leonard, J.R. Beck, W.L.:
Hematoporphyrin fluorescence: An aid in diagnosis
of malignant neoplasms.
Laryngoscope 81, 365-372 (1971)
35. Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Olsen, A.M.:
The use of a derivative of hematoporphyrin in
tumor detection.
J. Nat. cancer Inst 26 (1), 1-11 (1961)
36. Lipson, R.L., :
Hematoporphyrin derivative : a new aid for
endoscopic detection of malignant disease.
J. thoracic and cardiovas. surg. 42 (5), 623-629
(1961)
37. Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; Gray, M.J.:
Hematoporphyrin derivative for detection and
managemant of cancer.
Cancer 20, 2255-2257 (1967)
38. Lipson, R.L.:
The photodynamic properties of a particular
hematoporphyrin derivative.
Arch. Derm. 82, 508-516 (1960)
39. Meyer-Betz, F.:
Untersuchungen über die biologische
(photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins
und anderer Derivate des Blut- und
Gallenfarbstoffs.
Dt. Arch. Klin. Med. 112, 476-503 (1913)

40. Peterson, L.J.; Lund, D.J.:
Spectrophotometry of the canine bladder.
Invest. Urol. 15 (1), 55-56 (1977)

41. Policard, A.:
Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs
experimentales examinée à la lumiere de Woods
Compt. Rend. Soc. Biol. 91, 1423-1424 (1924)

42. Raab, O.:
Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf
Infusorien.
Archiv f. kl. Med. 56, 524-546 (1895)

43. Rübben, H.; Dahm, H.H.; Lutzeyer, W.:
Rezidivhäufigkeit und Tumorprogression
superficialer Harnblasenkarzinome.
Urologe A 20, 211-214 (1981)

44. Schmiedt, E.:
Die Operationsindikationen bei Nieren-,
Harnleiter-, Blasen und Harnröhrentumoren
in: Heberer, G.; Schweiberer, L.:
Indikation zur Operation; 2. Auflage 700-708
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1981)

45. Schwartz, S.:
Some relationships of porphyrins, x-rays and
tumors.
Bull. Minnesota Univ.School Med. 27, 7-13 (1955)

46. Spikes, J.D.:
Photobiology of porphyrins
The Clayton Foundation. Symposium on porphyrin
localization and treatment of tumors.
Hrsg. D. Doiron, Alan R. Liss, New-York (1984) im
Druck

47. Spikes, J.D.:
Porphyrins and related compounds as photodynamic Sensitizers.
Ann. N.Y. Acad. Sciences 244, 496-508 (1975)
48. v.Tappeiner, H.:
Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab.
MÜnch. Med. Wochenschr. 1, 5-7 (1900)
49. v.Tappeiner, H.; Jesionek, D.:
Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen.
MÜnch. Med. Wochenschr. 47, 2042-2044 (1903)
50. v.Tappeiner, H.:
Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe.
MÜnch. Med. Wochenschr. 45, 1810-1811 (1901)
51. Weishaupt, K.R.; Gomer, C.J.; Dougherty, T.J.:
Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor.
Cancer Res. 36, 2326-2329 (1976)
52. Zingg, E. J.:
Maligne Tumoren der Harnblase.
in: Urologie in der Klinik und Praxis, Band I, 520-553, Hrsg. Hohenfellner, R.; Zingg, E.J.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York (1982)
53. Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe

DANKSAGUNG

Dank schulde ich Herrn Prof.Dr. E.Schmiedt, dem Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität München, Klinikum Großhadern für die Oberaufsicht über diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Staehler, dem leitenden Oberarzt der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität München Großhadern bin ich für das rege Interesse am Fortgang dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Bei meinem Betreuer, dem Leiter des Forschungsvorhabens, Herrn Oberarzt Dr. D. Jocham von der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität München Großhadern, möchte ich mich herzlich für die Initiierung dieser Arbeit, für die tatkräftige Unterstützung, die vielen wertvollen Ratschläge und für die Durchsicht der Arbeit bedanken.

Herrn Prof Dr. W. Waidelich von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg bin ich großen Dank für die Zurverfügungstellung aller zur Durchführung der Arbeit nötigen technischen Geräte und des Arbeitsplatzes schuldig.

Bei Herrn Dr. E. Unsöld von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung und Beratung bei allen physikalischen und technischen Problemen bedanken.

Für die histologische Begutachtung der Präparate und die Anregungen zum Tiermodell möchte ich mich besonders bei Herrn Prof Dr. U Löhrs vom Pathologischen

Institut der Universität München bedanken.

Herrn Prof Dr. Dr. h.c. W. Brendel und Herrn Prof Dr. C. Hammer vom Institut für chirurgische Forschung der Universität München möchte ich dafür danken, daß sie mir bei den ersten Experimenten im Rahmen dieser Arbeit einen Arbeitsplatz zur Zellzüchtung und die Möglichkeit zur Tierhaltung und Tumorinduktion zur Verfügung stellten.

Herrn M. Weiß möchte ich für die Überlassung der Versuchsergebnisse bei der Bestrahlung von Ratten nach intraperitonealer Verabreichung von HpD (5.1.1.1) danken.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der einzelnen Institute, insbesondere bei Frl. H. Bayer, Frl. A. Popowitsch und Herrn W. Dietz bedanken.

LEBENS LAUF

Ralph Dietrich geb. am 23.08.1951 in München als Sohn des Schriftstellers Alfred Dietrich und seiner Frau Marianne, geb. Bauernfeind.

Schulbildung: Schuljahr 1957/58 - Schuljahr 1961/62: Volksschule II an der Gebelestr. 2 in München;

Schuljahr 1962/63 - Schuljahr 1970/71:
Luitpold Gymnasium, mathematisch naturwissenschaftliches Gymnasium an der Seeaustr. 1 in München;

Abitur 19 Juni 1971;

Hochschulstudium: WS 1971/72 - SS 1974: Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität in München;

WS 1974/75 - SS 1976: Studium der Physik und Chemie an der Ludwigs-Maximilian-Universität in München;

WS 1976/77 - SS 1982: Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilian-Universität in München;

November 1982: Staatsexamen und Approbation als Arzt;

seit September 1983 Assistenzarzt der chirurgischen Klinik des städtischen Marienkrankenhauses in Amberg/Obpf.;

seit Mai 1984 verheiratet mit Katharina Dietrich, geb. Brinkmann.

